

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):


- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

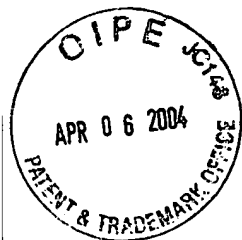
**Dated:** \_\_\_\_\_

1652



Examiner: D.J. Steadman

## {W:\02901\000J410000\00164115.DOC {XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX}}



Application No. (if known): 09/891,865

Attorney Docket No.: 02901/000J410-US0

## Certificate of Express Mailing Under 37 CFR 1.10

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail, Airbill No. \_\_\_\_\_ in an envelope addressed to:

**BL983948280US**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

on April 6, 2004  
Date

Signature

Typed or printed name of person signing Certificate

Note: Each paper must have its own certificate of mailing, or this certificate must identify each submitted paper.

Claim for Priority and Submission of Documents (1 page);  
Certified copy of Italian Application No. 1304500;  
Certificate of Express Mailing (1 page); and



*Ministero delle Attività Produttive*  
*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*  
*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*  
*Ufficio G2*

---

Autenticazione di copia di documenti relativi al brevetto per:

Invenzione Industriale

N.

1304500

rilasciato il

19.03.2001



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito e per la quale è stato rilasciato il brevetto sopraspecificato.*

**26 MAR. 2004**

Roma, li .....

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

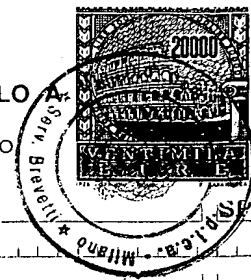
*Giampietro Carlotta*

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



## A. RICHIEDENTE (I)

NORPHARMA SPA

1) Denominazione

Residenza

VALLEAMBROSIA DI ROZZANO MILANO

codice

2) Denominazione

Residenza

codice

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome Dragotti Gianfranco ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

DRAGOTTI &amp; ASSOCIATI SRL

via Gall. san Babila

n.

4 C

città

MILANO

cap

20122

(prov)

MI

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sc)

gruppo/sottogruppo

CEPPI BATTERICI RICOMBINANTI PER LA PRODUZIONE DI NUCLEOSIDI NATURALI E DI ANALOGHI MODIFICATI

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) BESTETTI GIUSEPPINA

2) CALI' SIMONA

3) GHISOTTI DANIELA

4) ORSINI GAETANO

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
SR

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

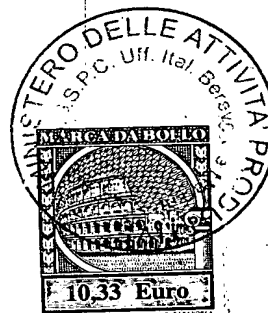
N° Protocollo

1)

2)

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI



## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc.	N. es.	PROV	n. pag.	Descrizione
Doc. 1)	2	PROV	41	Riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2)	2	PROV	15	disegno (obbligatorio se citato in descrizione 1 esemplare)
Doc. 3)	1	RIS		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4)	0	RIS		designazione inventore
Doc. 5)	0	RIS		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	0	RIS		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	0			nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire

NOVECENTOQUINDICIMILA.=

obbligatorio

COMPILATO IL 23 12 1998

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

p.p. NORPHARMA SPA

CONTINUA S/NO SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANO

codice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI98A 002792

Reg. A

L'anno millenovecento

NOVANTOTTO

il giorno

VENTITRE

del mese di

DECEMBRE

Il (I) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredate di n. 01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

timbro  
dell'ufficio

UFFICIALE ROGANTE

CORTONESE MAURIZIO

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01 di totali 01

DOMANDA N.

REG. A

M198ACC 2792

A. RICHIEDENTE (I)

N.G.

<input type="checkbox"/>	Denominazione		
	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
	Residenza		codice

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

05	TONON GIANCARLO		
06	ZUFFI GABRIELE		

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

SCIoglimento RISERVE

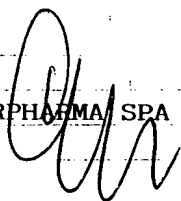
Data

N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

p.p.

NORPHARMA SPA



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

M/98A00 2792

REG. A

DATA DI DEPOSITO

23/12/1998

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (1)

Denominazione

NORPHARMA SPA

Residenza

VALLEAMBROSIA DI ROZZANO MILANO

D. TITOLO

CEPPI BATTERICI RICOMBINANTI PER LA PRODUZIONE DI NUCLEOSIDI NATURALI E DI ANALOGHI MODIFICATI

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Vengono descritti nuovi ceppi di microrganismi procarioti geneticamente modificati in grado di esprimere polipeptidi aventi l'attività enzimatica degli enzimi UdP e PNP; i ceppi in questione possono essere utilizzati direttamente per catalizzare reazioni di transglicosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice con rese particolarmente elevate. Vengono altresì descritti i relativi vettori plasmidici.

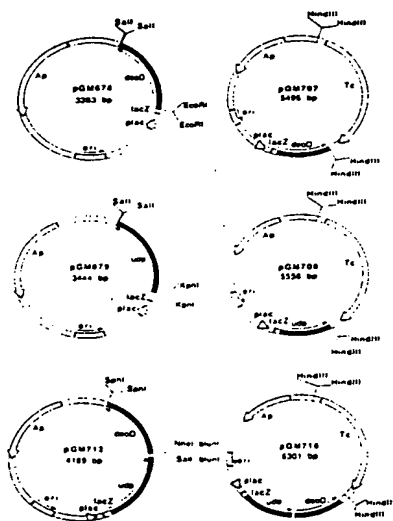


Figura 1. Mappa del plasmide in cui sono donati i geni *deoO* e *udp* di *E. coli*.



Q1

MI 9 8 A 0 0 2 7 9 2

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale a nome NORPHARMA SPA

\*\*\*\*\*

La presente invenzione si riferisce a nuovi ceppi batterici geneticamente modificati in grado di esprimere polipeptidi aventi l'attività enzimatica degli enzimi UdP e PNP; i ceppi in questione possono essere utilizzati per catalizzare reazioni di transglicosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice.

23 DIC. 1998

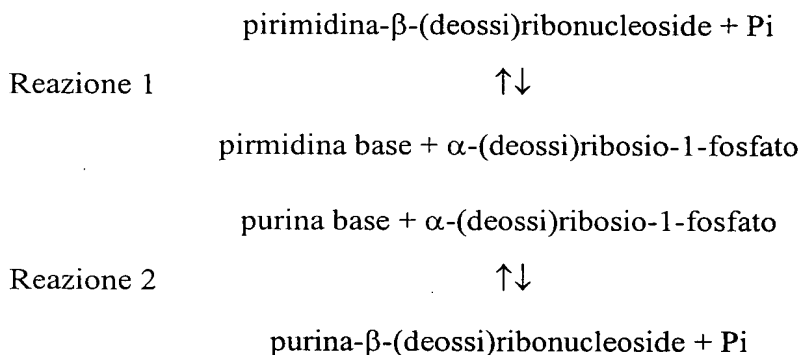
I nucleosidi naturali o gli analoghi modificati hanno importanti applicazioni, sia direttamente che come intermedi, nel campo dei farmaci ad azione antivirale ed antitumorale così come nella preparazione di oligonucleotidi per uso terapeutico e diagnostico.

I nucleosidi possono essere preparati con metodi di sintesi chimica che normalmente richiedono numerosi passaggi, procedure di protezione e deprotezione di gruppi labili e l'impiego di reagenti e condizioni operative che a livello industriale possono essere sia difficili da applicare che non economicamente convenienti. Queste reazioni hanno inoltre rese complessive generalmente non elevate a causa anche della formazione di miscele di stereo- e regio-isomeri dalle quali deve essere separato il composto di interesse.

Un approccio alternativo per la preparazione di nucleosidi ed analoghi modificati è basato sulla interconversione tra un nucleoside donatore di zucchero ed una base accettrice ad opera di enzimi che catalizzano le reazioni reversibili generali (Hutchinson, Trends Biotechnol. 8, 348-353, 1990) qui sotto riportate nello schema 1:

MI 9 8 A 0 0 2 7 9 2



**Schema 1**

dove Pi = fosfato organico

La reazione 1 è catalizzata dall'enzima uridina fosforilasi o Udp (E.C.2.4.2.2.) mentre la reazione 2 è catalizzata dall'enzima purina nucleoside fosforilasi o PNP (E.C. 2.4.2.1.).

Gli enzimi Udp e PNP possono essere impiegati singolarmente per catalizzare reazioni di transglicosilazione rispettivamente tra un nucleoside pirimidinico donatore ed una base pirimidinica accettrice o tra un nucleoside purinico donatore ed una base purinica accettrice. Inoltre, quando i due enzimi sono impiegati in combinazione, è possibile trasferire lo zucchero da un nucleoside pirimidinico donatore ad una base accettrice purinica o pirimidinica così come da un nucleoside purinico donatore ad una base accettrice pirimidinica o purinica, in dipendenza dei prodotti di partenza utilizzati. In ogni caso, le reazioni di fosforolisi comportano una inversione di configurazione della posizione 1 dello zucchero per dare un  $\alpha$ -zucchero-1-fosfato che costituisce il substrato intermedio delle reazioni di transglicosilazione e che viene successivamente trasferito sulla base accettrice, ripristinando la configurazione  $\beta$  originaria.

Queste reazioni enzimatiche possono essere convenientemente condotte a partire dalla miscela di un nucleoside donatore e di una base accettrice in presenza contemporaneamente dei due enzimi e senza isolamento dello zucchero fosfato intermedio oppure in due passaggi comportanti la fosforolisi con formazione dello zucchero fosfato intermedio, il suo isolamento e la successiva condensazione con la base accettrice.

Rispetto alla sintesi chimica, un importante vantaggio delle reazioni di transglicosilazione catalizzate dalle fosforilasi è il mantenimento della stereo-selettività e della regio-selettività per cui il prodotto finale mantiene la configurazione  $\beta$  dei nucleosidi naturali.

Gli enzimi Udp e PNP, che fisiologicamente prendono parte alle reazioni del catabolismo e dell'interconversione dei nucleosidi, sono il prodotto rispettivamente dei geni *udp* e *deoD* largamente distribuiti in natura e sono stati identificati e studiati sia in organismi procariotici che eucariotici (Parks e Agarwal, *Enzymes* 7, 3<sup>ed.</sup>, 483-514, Academic Press, New York; Munch-Petersen, *Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in micro-organisms*. Academic Press, London, 1982).

Dal punto di vista dell'impiego come catalizzatori per la sintesi di nucleosidi ed analoghi modificati, gli enzimi di organismi procariotici sono generalmente preferiti in quanto hanno una minore specificità di substrato e possono catalizzare reazioni di transglicosilazione a partire anche da nucleosidi donatori contenenti zuccheri modificati e da basi accettrici comprendenti sia strutture puriniche o pirimidiniche che sistemi eterociclici azotati diversi (Stoeckler *et al.*, *Biochemistry* 19, 102-107, 1980; Broska *et al.*, *Z.Naturforsch.*, 45, 59-70, 1990).

Cu

Le reazioni di transglicosilazione possono essere condotte utilizzando preparazioni enzimatiche purificate o parzialmente purificate (Krenitsky *et al.*, Biochemistry 20, 3615-3621, 1981; EP-002192) o, in alternativa, utilizzando le cellule batteriche intere di microrganismi selezionati in quanto contenenti gli enzimi necessari (Utagawa *et al.*, Agric.Biol.Chem. 49, 3239-3246, 1985) o cellule intere coltivate in presenza di induttori della produzione degli enzimi stessi (Dorskocil *et al.*, Collect. Czech. Chem. Commun. 42, 370-383, 1977).

Per le reazioni di biocatalisi condotte a livello preparativo, l'uso di cellule intere è generalmente preferibile rispetto all'uso degli enzimi isolati, in quanto permette sia di evitare l'estrazione e la purificazione degli enzimi che di recuperare facilmente le cellule al termine della reazione, per esempio per centrifugazione o per ultrafiltrazione, e di riutilizzarle per più cicli di reazione successivi. Sia UdP che PNP sono infatti enzimi caratterizzati da una buona stabilità termica che permette di condurre le reazioni di transglicosilazione a temperature fino a circa 60°C senza significative perdite di attività e di riutilizzare le preparazioni enzimatiche recuperate. Sono stati descritti anche approcci in cui il riciclo delle cellule usate come catalizzatori veniva realizzato mediante microincapsulazione in gel sia idrofilici (Votruba *et al.*, Collect.Czech.Chem. Commun. 59, 2303-2330, 1994) che idrofobici (Yokozeki *et al.*, Eur.J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 225-231, 1982).

I limiti principali dei metodi finora noti per preparare nucleosidi naturali ed analoghi modificati mediante reazioni di transglicosilazione con l'impiego di cellule batteriche risiedono nella bassa concentrazione enzimatica



On

ottenibile anche dopo induzione e nella impossibilità di utilizzare quantità ottimizzate delle due attività enzimatiche necessarie per catalizzare il trasferimento dello zucchero da un nucleoside donatore ad una base accettrice.

5 Infatti, sia nel caso di selezione di ceppi batterici nativi ("wild-type") che nel caso di coltivazione dei ceppi in condizioni di induzione, si ottengono cellule contenenti livelli di UdP e PNP generalmente non superiori a 50 volte i livelli basali ed in rapporti non predeterminabili. Inoltre, poichè uno dei due enzimi (generalmente PNP) è presente nelle cellule indotte in  
10 quantità inferiori, è solitamente necessario utilizzare un eccesso di cellule tale da garantire la presenza dell'enzima limitante a livelli compatibili con una accettabile cinetica complessiva della reazione di interconversione. Da un punto di vista operativo questo comporta che una porzione significativa della miscela di reazione risulta costituita dalla sospensione cellulare, con la  
15 conseguente limitazione del volume utilizzabile per la solubilizzazione dei substrati e, in definitiva, con una minore resa volumetrica di prodotto finale.

L'oggetto della presente invenzione è pertanto rappresentato dalla costruzione di ceppi batterici geneticamente modificati in grado di  
20 risolvere i problemi sopra descritti e, in particolare, di catalizzare reazioni di transglicosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice con rese elevate, prevedibili e soprattutto riproducibili su scala industriale e con cinetiche enzimatiche particolarmente rapide.

In letteratura sono stati descritti il clonaggio e l'espressione di alcune  
25 fosforilasi ricombinanti, quali per esempio UdP umana (Watanabe e

G

Uchida, Biochem.Biophys.Res.Comm. 216, 265-272, 1996), murina (Watanabe *et al.*, J.Biol.Chem. 270, 12191-12196, 1995), di *Escherichia coli* (Mikhailov *et al.*, Biochem. Internat. 26, 607-615, 1992) e PNP umana (Erion *et al.*, Biochemistry 36, 11725-11734, 1997), del microrganismo termofilo *Bacillus stearothermophilus* (Hamamoto *et al.*, Biosci.Biotech.Biochem. 61, 272-275, 1997; Hamamoto *et al.*, Biosci.Biotech.Biochem. 61, 276-280, 1997) oltre ad UdP e PNP da *Klebsiella* sp (Takehara *et al.*, Biosci.Biotech.Biochem. 59, 1987-1990, 1995).

- 10 Sono stati ora trovati e costituiscono uno degli oggetti della presente invenzione nuovi ceppi batterici geneticamente modificati contenenti i geni codificanti per polipeptidi aventi l'attività enzimatica degli enzimi UdP e PNP, sia separatamente che congiuntamente. La coltivazione di questi nuovi ceppi consente infatti di ottenere sia elevati livelli di biomassa che di
- 15 espressione degli enzimi ricombinanti; i nuovi ceppi secondo la presente invenzione possono essere inoltre utilizzati direttamente quali catalizzatori per la produzione di nucleosidi naturali e di analoghi modificati con rese sostanzialmente superiori rispetto a quanto consentito dalla tecnica nota.

- Come ospiti per l'espressione degli enzimi ricombinanti secondo la
- 20 presente invenzione sono preferibilmente utilizzabili cellule batteriche di *Escherichia coli*; particolarmente interessanti sono i ceppi K12 (preferibilmente DH5 $\alpha$  o MG1655) e/o i ceppi B; alternativamente possono essere comunque utilizzate cellule di altri microrganismi procarioti che siano accettabili per l'impiego industriale in quanto non

Ch

pericolosi per gli operatori e per l'ambiente e possano essere coltivati facilmente per ottenere livelli elevati di biomassa.

Secondo una delle realizzazioni della presente invenzione, le cellule batteriche di *Escherichia coli* sono state trasformate con vettori plasmidici

5 di espressione ricombinanti in cui sono stati clonati sia separatamente che contemporaneamente i geni *udp* e *deoD* di *E.coli*. Le sequenze geniche codificanti geni *udp* e *deoD* preferibilmente utilizzabili per gli scopi della presente invenzione sono depositate in banca dati EMBL con numero di accesso X15689 (*udp*) ed M60917 (*deoD*); possono tuttavia essere  
10 utilizzate anche altre sequenze comunemente disponibili, come per esempio AC CG01747 (*udp*) e AC CG00327 (*deoD*).

I vettori plasmidici di espressione utilizzabili per gli scopi dell'invenzione e che costituiscono uno degli oggetti della stessa sono caratterizzati dal comprendere:

- 15 a) almeno una sequenza genica codificante per un polipeptide avente l'attività dell'enzima UDP e/o dell'enzima PNP; e,  
b) almeno una sequenza genica codificante per la resistenza ad un antibiotico.

Detta almeno una sequenza codificante per la resistenza ad un antibiotico è  
20 preferibilmente una sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina e/o per la resistenza all'ampicillina; nella realizzazione preferita dell'invenzione, entrambe le sequenze sono presenti sul vettore plasmidico.

Come risulterà evidente dagli esempi, i vettori plasmidici della presente invenzione sono ottenibili clonando sia la sequenza codificante per *udp* e/o  
25 la sequenza codificante per *deoD* che, eventualmente, la sequenza

codificante per la resistenza alla tetraciclina sul plasmide pUC18 (Yanish e Perron, Gene 33, 103-119, 1985; numero di accesso EMBL L08752) che già contiene il gene per la resistenza all'ampicillina; la posizione relativa delle sequenze codificanti per *udp* e *deoD* non è comunque rilevante ai fini dell'invenzione. La sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina è preferibilmente il gene Tc di pBR322.

In particolare, la sequenza codificante per *udp* e/o la sequenza codificante per *deoD* sono inseriti sul plasmide in corretta fase di lettura rispetto al promotore batterico *lac*, già presente sul plasmide. Tuttavia, come si vedrà dagli esempi che seguono, la presenza di un promotore e in particolare del promotore *lac* non è un elemento essenziale per gli scopi della presente invenzione; la crescita cellulare e l'espressione dei polipeptidi è risultata infatti essere indipendente dalla presenza di un induttore (IPTG).

In questo modo, secondo metodiche ben note e che risulteranno evidenti dagli esempi, sono stati costruiti i seguenti plasmidi, raffigurati in figura 1:

- pGM679: gene *udp* clonato sul plasmide pUC18 (SEQ ID NO 1). Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM679 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 a 1021: sequenza del gene *udp* di E. coli; da 1022 a 3444: sequenza di pUC18.
- pGM708: gene *udp* clonato sul plasmide pUC18 insieme al gene per la resistenza alla tetraciclina (SEQ ID NO 2). Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM708 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 a 1021: sequenza del gene *udp* di E. coli; da 1022 a 1039: sequenza di



pUC18; da 1040 a 1482: sequenza di pHP45Ω da 1483 a 2883: sequenza del gene Tc di pBR322; da 2884 a 3151: sequenza di pHP45Ω; da 3152 a 5556: sequenza di pUC18.

- pGM678: gene *deoD* clonato sul plasmide pUC18 (SEQ ID NO 3).

5 Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM678 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 230: sequenza di pUC18; da 231 a 960: sequenza del gene *deoD* di *E. coli*; da 961 a 3383: sequenza di pUC18.

- pGM707: gene *deoD* clonato sul plasmide pUC18 insieme al gene per la resistenza alla tetraciclina (SEQ ID NO 4). Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM707 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 230: sequenza di pUC18; da 231 a 960: sequenza del gene *deoD* di *E. coli*; da 961 a 978: sequenza di pUC18; da 979 a 1422: sequenza di pHP45Ω da 1423 a 2822: sequenza del gene Tc di pBR322; da 2823 a 3090: sequenza di pHP45Ω da 3091 a 5495: sequenza di pUC18.

- pGM712: geni *udp* e *deoD* clonati sul plasmide pUC18 (SEQ ID NO 5). Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM712 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 a 1021: sequenza del gene *udp* di *E. coli*; da 1022 a 1025: sequenza di pUC18; da 1026 a 1036: sequenza di pBAD24; da 1037 a 1766: sequenza del gene *deoD* di *E. coli*; da 1767 a 1792: sequenza di pBAD24; da 1793 a 4189: sequenza di pUC18.

- pGM716: geni *udp* e *deoD* clonati sul plasmide pUC18 insieme al gene per la resistenza alla tetraciclina (SEQ ID NO 6). Nella numerazione



CU

della sequenza la coordinata 1 di pGM716 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 a 1021: sequenza del gene *udp* di *E. coli*; da 1022 a 1025: sequenza di pUC18; da 1026 a 1036: sequenza di pBAD24; da 1037 a 1766: sequenza del gene *deoD* di *E. coli*; da 1767 a 1792: sequenza di pBAD24, da 1793 a 1794: sequenza di pUC18, da 1795 a 2228 sequenza di pHP45 $\Omega$  da 2229 a 3628: sequenza del gene *Tc* di pBR322; da 3629 a 3896: sequenza di pHP45 $\Omega$ ; da 38971 a 6301: sequenza di pUC18.

- 10 I ceppi ricombinanti così ottenuti esprimono i polipeptidi aventi l'attività degli enzimi UdP e PNP in elevate quantità, minimizzando eventuali problemi di compatibilità e/o solubilità derivabili dalla presenza di proteine eterologhe.

- In particolare sono stati costruiti i ceppi batterici denominati
- 15 DH5 $\alpha$ /pGM678, MG1655/pGM678, DH5 $\alpha$ /pGM707 e MG1655/pGM707 che sovraesprimono l'enzima PNP, i ceppi DH5 $\alpha$ /pGM679, MG1655/pMG679, DH5 $\alpha$ /pGM708 e MG1655/pGM708 che sovraesprimono l'enzima UdP, ed i ceppi DH5 $\alpha$ /pGM712, DH5 $\alpha$ /pGM716 e MG1655/pGM716 che sovraesprimono
- 20 contemporaneamente gli enzimi PNP ed UdP. L'efficienza di questi nuovi ceppi, sia come produttori degli enzimi PNP ed UdP che come biocatalizzatori per la preparazione di nucleosidi mediante reazioni di bioconversione, è stata confrontata con una preparazione di cellule di *Enterobacter aerogenes* coltivate in presenza di induttori in quanto questo
- 25 microrganismo, secondo i dati di letteratura disponibili, è stato finora

C1

considerato uno dei migliori per la capacità di catalizzare le reazioni di transglicosilazione (Utagawa *et al.*, Agric.Biol.Chem. 49, 1053-1058, 1985; Utagawa *et al.*, Agric.Biol.Chem. 49, 2711-2717, 1985). L'uso dei nuovi ceppi ricombinanti nella produzione di polipeptidi aventi l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP e/o quali catalizzatori di reazioni di transglicosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice costituisce uno degli ulteriori oggetti della presente invenzione.

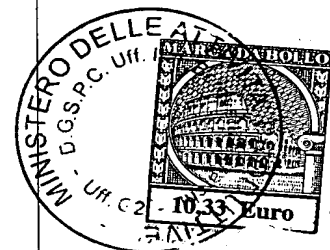
L'attività enzimatica dei ceppi ricombinanti è stata determinata incubando direttamente la sospensione cellulare in tampone fosfato con un nucleoside pirimidinico (per esempio uridina) per saggiare l'attività di UdP o con un nucleoside purinico (per esempio inosina) per saggiare l'attività di PNP e determinando la formazione rispettivamente della base pirimidinica (uracile) o purinica (ipoxantina) formatasi per cromatografia liquida ad alta pressione su fase inversa (RP-HPLC).

Applicando questo saggio sono stati misurati nei ceppi batterici ricombinanti oggetto della presente invenzione e nel ceppo di *E.aerogenes* di confronto le attività enzimatiche di UdP e PNP ottenendo i risultati riportati nella tabella 1, in cui si evidenzia come i ceppi ricombinanti hanno attività enzimatiche fino a circa 30-100 volte superiori rispetto al ceppo di confronto coltivato in condizioni di induzione.

Tabella 1

Comparazione delle attività enzimatiche di uridina fosforilasi (UdP) e purina nucleoside fosforilasi (PNP) nei ceppi di *E.coli* ricombinanti e nel ceppo di *E.aerogenes* di confronto.

Nuovi ceppi batterici secondo l'invenzione	Attività UdP unità/gr di cellule	Attività PNP unità/gr di cellule
MG1655 "wild-type"	$4,5 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,2$
MG1655/pGM707	$7,5 \pm 0,1$	$2400,0 \pm 50,0$
MG1655/pGM708	$1550,0 \pm 60,0$	$6,5 \pm 0,5$
MG1655/pGM716	$5400,0 \pm 450,0$	$850,0 \pm 30,0$
<b>Ceppo di confronto</b>		
<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048 non indotto	$3,7 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$
<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048 indotto	$168,3 \pm 2,9$	$19,0 \pm 2,2$



Le cellule intere dei ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione possono essere convenientemente utilizzate come biocatalizzatori per la preparazione di nucleosidi naturali e di analoghi modificati a partire da un nucleoside donatore di zucchero e da una base accettrice mediante reazioni di bioconversione che richiedono la presenza di un solo tipo di fosforilasi (UdP o PNP) o la presenza contemporanea di UdP e PNP secondo i seguenti schemi generali:

Qu

a) nucleoside-pirimidinicoP1 + base-pirimidinicaP2 → nucleoside-pirimidinicoP2 + base-pirimidinicaP1, in presenza di cellule ricombinanti che sovraesprimono UdP;

b) nucleoside-purinicoP1 + base-purinicaP2 → nucleoside-purinicoP2 + base purinicaP1, in presenza di cellule ricombinanti che sovraesprimono PNP;

c) nucleoside-pirimidinico + base-purinica → nucleoside-purinico + base-pirimidinica, in presenza di una miscela di cellule ricombinanti che sovraesprimono separatamente UdP e PNP o di cellule di un singolo ceppo ricombinante che co-esprime UdP e PNP;

d) nucleoside-purinico + base-pirimidinica → nucleoside-pirimidinico + base-pirimidinica, in presenza di una miscela di cellule ricombinanti che sovraesprimono separatamente UdP e PNP o di cellule di un singolo ceppo ricombinante che co-esprime UdP e PNP.

Si è inoltre notato che i plasmidi pGM678, pGM679 e pGM712, che contengono il solo gene per la resistenza all'ampicillina presentano una certa tendenza a polimerizzare in ceppi che portano la mutazione RecA<sup>-</sup>, quale per esempio il ceppo MG1655. Al contrario, i plasmidi pGM707, pGM708 e pGM716 che contengono sia il gene per la resistenza alla tetraciclina che quello per la resistenza all'ampicillina sono invece particolarmente stabili in cellule di questo tipo, sia in condizioni di crescita che in fase di espressione.

Secondo le informazioni riportate in letteratura, nelle reazioni di bioconversione catalizzate da UdP e PNP, come nucleosidi donatori si devono considerare sia i nucleosidi naturali o modificati contenenti D-

CU

ribosio e 2'-deossiribosio che nucleosidi contenenti il gruppo ribosilico modificato nelle posizioni 2', 3' e 5' ed in particolare nucleosidi nei quali lo zucchero sia costituito da  $\beta$ -D-arabinosio,  $\alpha$ -L-xilosio, 3'-deossiribosio, 3'-5'-deossiribosio, 2'-3'-dideossiribosio, 5'-deossiribosio, 2'-5'-dideossiribosio, 2'-ammino-2'-deossiribosio, 3'-ammino-3'-deossiribosio, 2'-fluoro-2'-deossiribosio. Le basi accettrici che possono essere usate nelle reazioni di bioconversione catalizzate da UdP e PNP sono le basi pirimidiniche e puriniche naturali o sostituite, in particolare le basi puriniche sostituite nelle posizioni 1, 2 e 6, le basi pirimidiniche sostituite in posizione 3 e 5 oltre ad altri sistemi eterociclici contenenti uno o più atomo di azoto quali per esempio purina, 2-azapurina, 8-azapurina ed analoghi sostituiti, 1-deazapurina (imidazopiridina), 3-deazapurina, 7-deazapurina ed analoghi sostituiti, triazolo ed analoghi sostituiti, pirazolo ed analoghi sostituiti, composti imidazolici ed analoghi sostituiti.

Un'altra modalità di preparazione dei nucleosidi naturali e modificati resa possibile dalla presente invenzione è l'impiego delle cellule ricombinanti per catalizzare la reazione di fosforolisi di un nucleoside donatore (impiegando UdP o PNP secondo la base presente nel nucleoside donatore) ed ottenere l' $\alpha$ -zucchero-1-fosfato che può essere eventualmente isolato mediante tecniche di cromatografia, di estrazione o di precipitazione ed essere utilizzato nella successiva reazione di trasferimento dello zucchero su una appropriata base accettrice in presenza di UdP o PNP (in dipendenza della natura della base accettrice).

La disponibilità di ceppi batterici ricombinanti che sovraesprimono separatamente gli enzimi UdP e PNP permette inoltre di stabilire le

condizioni delle reazioni di transglicosilazione in termini di attività ottimale di ciascuno dei due enzimi attraverso prove preliminari in cui la reazione viene condotta in presenza di miscele contenenti proporzioni variabili di cellule di ciascuno dei due ceppi. Per ogni reazione di transglicosilazione è

5 perciò possibile definire su scala analitica i rapporti ottimali di attività enzimatica di UdP e di PNP mentre nel successivo scale-up preparativo possono essere impiegati sia la miscela di cellule dei due ceppi che esprimono UdP e PNP singolarmente, sia il solo ceppo che co-esprime UdP e PNP qualora i loro rapporti siano già ottimali, sia eventualmente il ceppo  
10 che co-esprime UdP e PNP integrato con cellule dei ceppi esprimenti UdP o PNP.

Come esempio di ottimizzazione delle reazioni di bioconversione nella presente invenzione sono descritte dettagliatamente le procedure relative alla preparazione di 9- $\beta$ -D-arabinofuranosiladenina (Ara-A) e di 1- $\beta$ -D-  
15 ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carbossammide (ribavirina) che indicavano che i migliori risultati si ottenevano con rapporti di attività UdP:PNP rispettivamente di 2 : 1 e di 1 : 1 e con una concentrazione di 10 unità/ml di UdP e di 5 unità/ml di PNP per Ara-A e di 10 unità/ml sia di UdP che di PNP per ribavirina. Questi parametri, che sono facilmente implementabili  
20 utilizzando i ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione, permettevano di ottimizzare la concentrazione di cellule da usare come biocatalizzatori ottenendo, nel contempo, la massima resa di bioconversione compatibile con le costanti di equilibrio delle reazioni enzimatiche e la riduzione dei tempi di reazione. Analogamente possono

Cm

essere ottimizzate tutte le reazioni di transglicosilazione per la preparazione di nucleosidi ed analoghi modificati.

I nuovi ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione permettono di preparare nucleosidi naturali e nucleosidi modificati con risultati  
5 significativamente migliori rispetto alle tecnologie enzimatiche finora note che sono basate sull'uso di enzimi isolati o sull'uso di cellule batteriche di ceppi di microrganismi wild-type e di ceppi di microrganismi coltivati in condizioni di induzione delle attività degli enzimi fosforilasici.

Il confronto di diverse reazioni di transglicosilazione condotte utilizzando  
10 rapporti costanti tra concentrazione di nucleoside donatore (60 mM) e base accettrice (20 mM) ed in cui è stato calcolato un parametro di produttività (Simon *et al.*, Angew.Chem 24, 539-553, 1985) che tiene in considerazione oltre che l'attività specifica anche fattori operativi quali per esempio i fenomeni di trasporto intra- ed extra-cellulari e la concentrazione  
15 volumetrica dei prodotti finali indica che l'uso dei ceppi ricombinati oggetto della presente invenzione è costantemente caratterizzato da una maggiore efficienza di bioconversione e da una più elevata produttività per unità di tempo e di volume rispetto all'uso di microrganismi convenzionali (tabella 2).

20 **Tabella 2. Confronto dell'efficienza delle reazioni di transglicosilazione catalizzate da cellule ricombinanti di *Escherichia coli* (E) e da cellule di *Entereobacter aerogens* di controllo (C).**

Le reazioni sono state condotte a 60°C per il tempo indicato utilizzando le stesse concentrazioni di nucleoside donatore (60 mM) e di base accettrice  
25 (20 mM). La resa di bioconversione è stata calcolata rispetto alla base



accettrice mediante analisi RP-HPLC della miscela di reazione.

L'efficienza della reazione è espressa dall'indice di produttività P, calcolato dalla seguente formula  $P = n \cdot m^{-1} \cdot t^{-1} \cdot 1000$  dove n = concentrazione del prodotto finale (g/l); m = pasta cellulare umida (g/l di miscela di reazione) e

5 t = tempo di reazione in ore.

Prodotto	Nucleoside 60 mM	Base 20 mM	Pasta cellulare g/100 ml		t ore		Bioconversione %		P	
			C	E	C	E	C	E	C	E
Ribavirinaa	Uridina	1,2,4-triazol 3-carbossi ammide	5	0,1	25	6	85	92	3	750
2'-deossi guanosina	2'-deossi uridina	Guanina	5	0,5	4	2	80	86	25	550
2'-deossi adenosina	2'-deossi uridina	Adenina	1	0,05	2	1	95	95	240	9600
Timidina	2'-deossi uridina	Timina	0,5	0,05	1	3	59	60	600	2000
2'-deossi ribofuranosil 2,6-diammino purina	2'-deossi uridina	2,6-diammino purina	2	0,05	2	1,5	89	91	125	6660
Ara-A	Ara-U	Adenina	5	0,5	20	2	85	87	5	480

In particolare, come si evidenzia nell'esempio riportato nella tabella 3 riguardante la preparazione di Ara-A a partire da Ara-U ed adenina, l'impiego dei ceppi ricombinanti permette di migliorare sia dal punto di



vista tecnico che economico i processi di bioconversione tradizionali e di ottenere rese di bioconversione più elevate, tempi di reazione inferiori, più elevata resa volumetrica dei prodotti finali con l'impiego di una minore concentrazione di cellule.

5 **Tabella 3. Confronto delle condizioni operative per la preparazione di Ara-A mediante transglicosilazione catalizzata da cellule ricombinanti di *E.coli* e da una preparazione di *E.aerogenes* di confronto.**

Condizioni operative	Cellule <i>E.coli</i> ricombinanti	Cellule <i>E.aerogenes</i>
Ceppo	MG1655/pGM716	<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048 indotto
Rapporto Ara-U : Adenina	75 : 75 (mM)	40 : 40 (mM)
Concentrazione cellule	0,5%	5%
Tempo di reazione	4 ore	20 ore
Resa di bioconversione	70%	55%
Resa volumetrica	13 g Ara-A/litro	5 g Ara-A/litro

Un ulteriore vantaggio derivante dall'impiego dei ceppi ricombinanti è costituito dalla semplificazione dei processi di recupero e riutilizzo della

10 biomassa cellulare derivati dalla presenza di una minore concentrazione di cellule; così per esempio l'eventuale recupero delle cellule per filtrazione od ultrafiltrazione ed il loro successivo riciclo, risulta notevolmente più rapido nel caso dell'impiego dei ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione. In alcuni casi, in particolare quando si impiegano substrati con  
15 elevata affinità per gli enzimi, la concentrazione di cellule ricombinanti necessaria si riduce a valori così bassi che può risultare economicamente

Cm

conveniente evitare il recupero delle cellule con una ulteriore semplificazione del processo produttivo.

Gli esempi di seguito riportati hanno lo scopo di illustrare la presente invenzione senza che costituiscano una limitazione del suo campo di applicazione.

### **Esempio N°1**

#### Clonaggio del gene *udp* di *Escherichia coli* in un vettore di espressione.

La sequenza del gene *udp* di *E. coli* è stata reperita nella banca dati EMBL con il numero di accesso X15689.

- 10 Il gene è stato amplificato per PCR con gli oligonucleotidi 5'-ATCGGTACCATCCATGTCCAAGTCTGATGTTTTTCATCTC-3' e 5'-AGACGGTCGACAAGAGAATTACAGCAGACGACGC-3' dal ceppo di *E. coli* K12 MG1655 (Singer *et al.*, Microbiol. Rev. 53. 1-24. 1989). La regione amplificata comprende l'intera sequenza del gene *udp* a partire dal
- 15 codone d'inizio ATG fino a 7 bp a valle del codone di stop TAA. Al 5' del gene è stato inserito un sito di restrizione *KpnI*, seguito da quattro basi scelte a caso, al 3' del gene è presente un sito *Sall*. Il frammento amplificato, digerito con *KpnI* e *Sall*, è stato clonato nella regione polylinker del vettore pUC18, che porta il gene per la resistenza ad
- 20 ampicillina (Yanish e Perron, Gene 33, 103-119, 1985; numero di accesso EMBL L08752). Dopo trasformazione del ceppo DH5 $\alpha$  (Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983) è stato ottenuto il plasmide pGM679 (figura 1). Nel costrutto si crea una fusione tra i primi codoni del gene *lacZ* di pUC18 e l'intera sequenza di *udp* (figura 2) e la trascrizione è sotto il controllo del
- 25 promotore *lac* del vettore.

Ar

La regione clonata è stata interamente sequenziata ed è stata riscontrata la perfetta identità con la sequenza in banca dati. La sequenza del plasmide pGM679 è riportata in figura 3.

Nel plasmide pGM679 è stato successivamente inserito il gene Tc di pBR322, che conferisce resistenza alla tetraciclina (Bolivar *et al.*, Gene 2, 95-113, 1977; numero di accesso EMBL J01749). Il gene, preceduto dal suo promotore, è stato ottenuto per digestione *Hind*III dall'interposone pHP45Ω708-Tc (Fellay *et al.*, Gene 52, 147-154, 1987) e clonato nel sito *Hind*III di pGM679. Il plasmide risultante è stato denominato pGM708 (figura 1). La sua sequenza completa è riportata in figura 3.

### Esempio N°2

#### Clonaggio del gene *deoD* di *Escherichia coli* in un vettore di espressione.

La sequenza del gene *deoD* di *E. coli* è stata reperita nella banca dati EMBL con il numero di accesso M60917.

Il gene è stato amplificato per PCR con gli oligonucleotidi 5'-CTGAATTCTTCCATGGCTACCCCACACATTAATGCAG-3' e 5'-TCATGGTCGACTTACTCTTTATCGCCCAGCAGAACG-3' dal ceppo di *E. coli* K12 MG1655 (Singer *et al.*, Microbiol. Rev. 53, 1-24, 1989). La regione amplificata comprende l'intera sequenza del gene *deoD* a partire dal codone d'inizio ATG fino al codone di stop TAA. Al 5' del gene è stato inserito un sito di restrizione *Eco*RI, seguito da quattro basi scelte a caso, al 3' del gene è presente un sito *Sal*I. Il frammento amplificato, digerito con *Eco*RI e *Sal*I, è stato clonato nella regione polylinker del vettore pUC18, che porta il gene per l'ampicillina resistenza (Yanish e Perron, Gene 33, 103-119, 1985; numero di accesso EMBL L08752). Dopo trasformazione



del ceppo DH5 $\alpha$  (Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983) è stato ottenuto il plasmide pGM678 (figura 1). Nel costrutto si crea una fusione tra i primi codoni del gene *lacZ* di pUC18 e l'intera sequenza di *deoD* (figura 2) e la trascrizione è sotto il controllo del promotore *lac* del vettore.

- 5 La regione clonata è stata interamente sequenziata ed è stata riscontrata la perfetta identità con la sequenza in banca dati. La sequenza del plasmide pGM678 è riportata in figura 3.

Nel plasmide pGM678 è stato successivamente inserito il gene Tc, che conferisce resistenza alla tetraciclina, in modo analogo a quanto descritto  
10 nell'esempio N° 1. Il plasmide risultante è stato denominato pGM707 (figura 1). La sua sequenza completa è riportata in figura 3.

### Esempio N°3

#### Clonaggio dei geni *udp* e *deoD* in un unico vettore d'espressione.

- I geni *udp* e *deoD* sono stati clonati nello stesso vettore allo scopo di  
15 esprimere contemporaneamente gli enzimi UDP e PNP all'interno della stessa cellula. Ciò è stato ottenuto inserendo il gene *deoD* nel plasmide pGM679, a valle di *udp*. Per la costruzione, il frammento *EcoRI-SalI* di pGM678, contenente il gene *deoD*, è stato clonato nel vettore pBAD24 (Guzman et al., J. Bacteriol. 177, 4121-4230, 1995; numero di accesso  
20 EMBL X81838). Il frammento *NheI* (con le estremità riempite) - *SphI* di questo costrutto è stato clonato in pGM679, digerito *SalI* (riempito)-*SphI*, ottenendo pGM712 (Figura 1). In pGM712 entrambi i geni *udp* e *deoD* sono trascritti a partire dal promotore *lac*, ma la traduzione di *deoD* è indipendente da quella di *udp*, in quanto a monte di *deoD* è presente una  
25 sequenza per l'attacco dei ribosomi (figura 2). Va notato che la proteina

PNP espressa da pGM712 è identica a quella selvatica, in quanto è stata eliminata la fusione con i primi codoni di *lacZ* al 5' del gene (figura 2). La sequenza completa di pGM712 è riportata in figura 3.

Nel plasmide pGM712 è stato successivamente inserito il gene Tc, che conferisce resistenza alla tetraciclina, come descritto nell'esempio N° 1. Il plasmide risultante è stato denominato pGM716 (figura 1). La sua sequenza completa è riportata in figura 3.

#### **Esempio N°4.**

##### Trasformazione di *E. coli*.

Il ceppo di *E. coli* K12 DH5 $\alpha$ , che porta la mutazione *recA1* (Hanahan, J.Mol.Biol. 166, 557-580, 1983), e il ceppo wild-type MG1655 (Singer *et al.*, Microbiol.Rev. 53, 1-24, 1989) sono stati trasformati con i plasmidi pGM678, pGM679, pGM707, pGM708, pGM712 e pGM716. Il genotipo dei ceppi e alcune caratteristiche dei ceppi ricombinanti sono riportate in tabella 4 e 5. I trasformanti di pGM678, pGM679 e pGM712 sono stati selezionati su terreno contenente ampicillina (50  $\mu$ g/ml) e quelli di pGM707, pGM708 e pGM716 su terreno contenente tetraciclina (12,5  $\mu$ g/ml).

**Tabella 4. Genotipo dei ceppi ospiti.**

Ceppo		Genotipo	Referenza
<i>E. coli</i>	K12	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , <i>thi</i> 1,	Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983
	DH5 $\alpha$		

	<i>gyrA96, relA1</i>	
<i>E.coli</i> K12 MG1655	LAM- <i>rph-1</i>	Singer <i>et al.</i> , Microbiol. Rev. 53, 1-24, 1989

**Tabella 5. Caratteristiche dei nuovi ceppi ricombinanti.**

Denominazione del ceppo	Espressione delle proteine clonate	Resistenza
DH5 $\alpha$ /pGM678	purina nucleoside fosforilasi	ampicillina
DH5 $\alpha$ /pGM679	uridina fosforilasi	ampicillina
DH5 $\alpha$ /pGM707	purina nucleoside fosforilasi	tetraciclina/a mpicillina
DH5 $\alpha$ /pGM708	uridina fosforilasi	tetraciclina/a mpicillina
DH5 $\alpha$ /pGM712	purina nucleoside fosforilasi e uridina fosforilasi	ampicillina
DH5 $\alpha$ /pGM716	purina nucleoside fosforilasi e uridina fosforilasi	tetraciclina/a mpicillina
MG1655/pGM678	purina nucleoside fosforilasi	ampicillina
MG1655/pGM679	uridina fosforilasi	ampicillina
MG1655/pGM707	purina nucleoside fosforilasi	tetraciclina/a mpicillina

MG1655/pGM708	uridina fosforilasi	tetraciclina/a mpicillina
MG1655/pGM716	purina nucleoside fosforilasi e uridina fosforilasi	tetraciclina/a mpicillina

La presenza del plasmide nei ceppi trasformati è stata confermata da estrazione del DNA plasmidico e analisi su gel di agarosio 0,6%.

La crescita dei ceppi trasformati in brodo LD (composizione per litro: 10 g Bactotryptone (Difco), 5 g Yeast extract (Difco), 5 g NaCl) o in terreno solido (LD + 10 g/l agar), addizionati di ampicillina (50 µg/ml) o tetraciclina (12,5 µg/ml, solo per i ceppi trasformati con pGM707, pGM708 e pGM716) è paragonabile a quella dei ceppi di controllo, trasformati con il vettore pUC18. Inoltre, i ceppi trasformati con i plasmidi pGM707, pGM708, pGM716, che portano la doppia resistenza, non mostrano differenze di crescita in presenza di ampicillina e di tetraciclina.

### Esempio N°5

#### Valutazione dell'espressione delle proteine UdP e PNP nei ceppi ricombinanti.

Preculture dei ceppi ricombinanti sono state ottenute inoculando cloni singoli in terreno LD addizionato di antibiotico e incubando a 37°C statico per una notte. Le colture sono state diluite 1 : 20 in terreno LD + antibiotico in beuta e incubate a 37°C con agitazione fino al raggiungimento della fase stazionaria, corrispondente a valori di densità cellulare di circa 2 unità di densità ottica a 600 nm. Le proteine totali estratte da 1 ml di coltura sono state separate su gel di poliacrilammide 15% in condizioni riducenti (SDS-



CM

PAGE) e le proteine sono state evidenziate per colorazione con Comassie.

Le proteine PNP ed UdP sono state identificate in base al peso molecolare di circa 26,6 kDa per PNP e 28,2 kDa per UdP. Il risultato ottenuto dagli estratti dei ceppi MG1655/pGM707, pGM708 e pGM716 è riportato nella

5 figura 4. L'analisi elettroforetica dimostra che in tutti i campioni esaminati si ha sovraespressione di UdP e PNP in quanto le bande proteiche corrispondenti rappresentano una significativa percentuale delle proteine cellulari totali; questo risultato è confermato dalla determinazione quantitativa delle attività enzimatiche riportata nella tabella 1.

10 Poiché nei ceppi ricombinanti, i geni *deoD* ed *udp* sono clonati sotto il controllo del promotore *lac*, la crescita delle cellule e l'espressione delle proteine UdP e PNP sono state controllate sia in assenza che in presenza di 40 mg/l di IPTG come induttore della trascrizione. I risultati ottenuti hanno indicato che la presenza di IPTG non modifica la crescita cellulare e non

15 aumenta il livello di espressione PNP ed UdP (ciò è dovuto all'insufficiente quantità di repressore in questi ceppi). Quest'ultimo risultato indica che nei ceppi ricombinanti oggetto della presente invenzione l'espressione dei geni *deoD* ed *udp* è costitutiva e raggiunge livelli molto elevati senza fenomeni di letalità o diminuita vitalità cellulare.

20 **Esempio N° 6.**

Determinazione dell'attività enzimatica e delle costanti cinetiche degli enzimi di uridina fosforilasi e purina nucleoside fosforilasi espressi intracellularmente in cellule batteriche ricombinanti.



Cm

La crescita dei ceppi è stata condotta come descritto nell'esempio N° 5. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione, pesate come pasta cellulare umida e conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dei dosaggi enzimatici.

L'attività dell'enzima UdP è stata determinata in un saggio di fosforolisi

5 incubando per 5 min a  $30^{\circ}\text{C}$  una quantità nota di sospensione batterica in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenente 60 mM del substrato uridina.

La reazione enzimatica è stata bloccata acidificando con HCl 0,1N, le cellule sono state eliminate per filtrazione e la soluzione filtrata è stata analizzata per RP-HPLC su colonna C18 (Hypersyl 100; 4,6 x 250 mm)

10 eluendo in condizioni isocratiche con una fase mobile costituita da 0,02 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in metanolo- $\text{H}_2\text{O}$  (4 : 96 v/v) portata a pH 4,5 con  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La quantità di uracile formatosi nella reazione veniva determinata in riferimento ad una curva standard e l'attività enzimatica della preparazione cellulare era calcolata in  $\mu\text{moli uracile/min/gr}$  pasta cellulare umida

15 (unità/gr). L'attività dell'enzima PNP è stata determinata in un saggio di fosforolisi incubando per 10 min a  $30^{\circ}\text{C}$  una quantità nota di sospensione batterica in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenente 50 mM del substrato inosina. La reazione enzimatica è stata bloccata acidificando con HCl 0,1 N, le cellule sono state eliminate per filtrazione e la soluzione

20 filtrata è stata analizzata per RP-HPLC su colonna C18 (Hypersyl 100; 4,6 x 250 mm) eluendo in condizioni isocratiche con una fase mobile costituita da 0,02 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in metanolo- $\text{H}_2\text{O}$  (4 : 96 v/v) portata a pH 4,5 con  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La quantità di ipoxantina formatasi nella reazione veniva determinata in riferimento ad una curva standard e l'attività enzimatica

della preparazione cellulare era calcolata in  $\mu\text{moli ipoxantina/ min/gr}$  pasta cellulare umida (unità/gr).

Le costanti cinetiche dell'enzima UdP sono state determinate incubando in doppio aliquote di pasta cellulare ottenuta dalla fermentazione del ceppo

5 MG1655/pGM708 corrispondenti a 0,62 unità enzimatiche in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenenti concentrazioni crescenti dei seguenti substrati: uridina (da 1 mM a 60 mM); 2'-deossiuridina (da 1 mM a 60 mM) e  $\beta$ -D-arabinofuranosil-uracile o Ara-U (da 10 mM a 120 mM). L'affinità per il fosfato (co-substrato della reazione di fosforilasi) è stata  
10 determinata in un sistema di incubazione analogo contenente 60 mM uridina e concentrazioni di fosfato crescenti da 2 mM a 100 mM. La formazione di uracile è stata determinata per RP-HPLC come precedentemente descritto.

I parametri cinetici sono stati calcolati elaborando i risultati ottenuti sono  
15 stati con il software Enzifitter secondo il metodo doppio reciproco di Lineweaver-Burk (J.Am.Chem.Soc. 56, 658, 1934) per ottenere i valori della costante apparente di affinità ( $K_m$ ) e della velocità massima ( $V_{max}$ ) riportati nella tabella 6.

**Tabella 6. Costanti cinetiche dell'enzima uridina fosforilasi ricombinante espresso intracellularmente in un ceppo trasformato di *E.coli***

Substrato	$K_m$ mM	$V_{max}$ unità x min <sup>-1</sup>
Uridina	$5,68 \pm 0,13$	$0,77 \pm 0,06$

2'-deossiuridina	$2,64 \pm 0,10$	$0,42 \pm 0,01$
Ara-U	$18,30 \pm 2,44$	$0,35 \pm 0,01$
Fosfato	$14,7 \pm 2,30$	$0,36 \pm 0,02$

Le costanti cinetiche dell'enzima PNP sono state determinate incubando in doppio aliquote di pasta cellulare ottenuta dalla fermentazione del ceppo MG1655/pGM707) corrispondenti a 0,96 unità di attività enzimatica in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenenti concentrazioni crescenti del substrato inosina (da 1 mM a 60 mM); l'affinità per il fosfato (co-substrato della reazione di fosforolisi) è stata determinata in un sistema di incubazione analogo contenente 40 mM inosina e concentrazioni di fosfato da 0,5 mM a 100 mM. La formazione di ipoxantina è stata determinata per RP-HPLC come precedentemente descritto ed i risultati ottenuti sono stati elaborati con il software Enzifitter secondo il metodo doppio reciproco di Lineweaver-Burk per ottenere i valori della costante apparente di affinità (Km) e della velocità massima (Vmax) riportati nella tabella 7.

**Tabella 7. Costanti cinetiche dell'enzima purina nucleoside fosforilasi ricombinante espresso intracellularmente in un ceppo trasformato di *E.coli*.**

Substrato	Km mM	Vmax unità x min <sup>-1</sup>
Inosina	$1,78 \pm 0,17$	$0,24 \pm 0,01$
Fosfato	$6,40 \pm 0,50$	$0,43 \pm 0,01$

**Esempio N° 7**



### Fermentazione dei ceppi ricombinanti

Preinoculo: un clone singolo dei ceppi MG1655/pGM707, pGM708 e pGM716 è stato inoculato in 10 ml LD con tetraciclina (12,5 µg/ml) e incubato per una notte a 37°C statico.

- 5 Un'aliquota di 1,5 ml della coltura è stata utilizzata per un'estrazione rapida di DNA plasmidico (Holmes and Quickley, Anal. Biochem. 114, 193-197, 1981) che successivamente è stato separato su gel di agarosio 0,6% per verificare la presenza di plasmide in forma monomerica. L'estrazione di DNA plasmidico e la verifica della presenza di forme monomeriche viene  
10 effettuata, come controllo, sia nelle precolture che precedono la fermentazione che su campioni di coltura prelevati alla fine della fermentazione.

- La coltura viene utilizzata per l'inoculo di 200 ml di terreno avente la seguente composizione: 20 g/l di peptone, 10 g/l di estratto di lievito e 10  
15 g/l di NaCl. La coltura ottenuta dopo una crescita a 28° C per 14 ore è stata utilizzata per l'inoculo di un fermentatore da 10 l sterilizzato in autoclave e caricato con 4 litri di terreno avente la seguente composizione: 20 g/l di Peptone (Difco); 36 g/l di estratto di lievito (Difco); 3,2 g/l di K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 g/l di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g/l di MgSO<sub>4</sub> e 0,5 g/l di antischiuma 1520 (Dow  
20 Corning). Durante la fase produttiva la temperatura era mantenuta a 30°C e l'ossigenazione era mantenuta da un flusso di 1 litro d'aria/litro di brodocoltura/min. L'agitazione iniziale di 200 giri/min era modificata automaticamente in relazione alla concentrazione dell'ossigeno disciolto in modo da mantenere un livello di ossigeno disciolto pari al 30% della  
25 concentrazione di saturazione. Durante la fermentazione il valore del pH

era mantenuto a 7 con aggiunte di  $H_2SO_4$  diluito. La fermentazione era interrotta quando la crescita batterica, misurata come  $OD_{600nm}$ , si stabilizzava su un valore massimo (circa 35-40  $OD_{600nm}$ ). La massa cellulare era raccolta per centrifugazione, sospesa ed agitata brevemente in  
5 tampone fosfato 30 mM-pH 7 e ricentrifugata. La pasta cellulare ottenuta (circa 50-70 grammi di pasta cellulare umida per litro di brodocoltura) era mantenuta a  $-20^{\circ}C$  fino al momento dell'utilizzazione.

### **Esempio N° 8**

#### Reazioni di transglicosilazione su scala di laboratorio e calcolo dell'indice di 10 produttività.

Le reazioni di transglicosilazione sono state condotte utilizzando diversi nucleosidi donatori di zucchero alla concentrazione di 60 mM (uridina, 2'-deossiuiridina, Ara-U) e diverse basi accettrici alla concentrazione di 20 mM (1-2-4-triazol-3-carbossammide, guanina, adenina, timina, 2,6  
15 diammino-purina) a pH 7 in tampone fosfato (30 mM) in presenza di diverse concentrazioni di pasta cellulare derivate sia da colture del microrganismo di controllo *E.aerogenes* che da colture del ceppo di *E.coli* ricombinante MG1655/pGM716 che sovraesprime gli enzimi UdP e PNP.

Le reazioni sono state condotte a  $60^{\circ}C$  per diversi periodi di tempo (da 1  
20 ora a 25 ore) e la percentuale di bioconversione, rispetto alla concentrazione iniziale di base accettrice, era determinata mediante analisi RP-HPLC della miscela di reazione diluita. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 2.

Per ogni reazione è stato calcolato l'indice di produttività P, applicando la  
25 seguente formula:

Cu

$$P = n \cdot m^{-1} \cdot t^{-1} \cdot 1000$$

dove  $n$  = concentrazione del prodotto finale (g/l)

$m$  = pasta cellulare umida (g/l miscela di reazione)

$t$  = tempo di reazione in ore

- 5 L'indice di produttività rappresenta una misura complessiva dell'efficienza della reazione in quanto tiene conto sia delle caratteristiche proprie dell'interazione enzima-substrato che di parametri operativi quali il tempo di reazione, la quantità di cellule impiegate e la resa volumetrica di prodotto finale.

10 **Esempio N°9**

Ottimizzazione dell'impiego di cellule di *E.coli* ricombinante nelle reazioni di transglicosilazione.

- Le preparazioni di ribavirina a partire da uridina (60 mM) e 1,2,4-triazol-3-carbossammide (40 mM) e di Ara-A a partire da Ara-U (40 mM) ed adenina (40 mM) sono state studiate come esempi di ottimizzazione dell'impiego di cellule ricombinanti di *E.coli* nelle reazioni di bioconversione. In ogni caso le reazioni erano condotte a 60°C in presenza di 30 mM di potassio fosfato a pH 7 e di quantità diverse di pasta cellulare ottenuta dalla fermentazione dei ceppi MG1655/pGM707 (sovraesprimenti l'enzima Udp) ed
- 15
- 20 MG1655/pGM708 (sovraesprimenti l'enzima PNP). Ad intervalli prestabiliti, aliquote della miscela di reazione erano prelevate ed analizzate per RP-HPLC per determinare la percentuale di bioconversione (calcolata rispetto alla concentrazione di base accettrice).

- Lo studio è stato inizialmente condotto incubando per 20 ore la miscela di
- 25 reazione in presenza di una concentrazione limitante di pasta cellulare (con

attività enzimatica totale uguale o inferiore a 2 unità/ml) ed operando in modo da avere rapporti di unità enzimatiche di UdP ed unità enzimatiche di PNP variabili nelle seguenti proporzioni 5:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:5.

I risultati ottenuti nelle due reazioni di bioconversione sono riportati nella  
5 tabella 8.

**Tabella 8. Studio delle condizioni delle reazioni di transglicosilazione.**

**1° fase**

Le reazioni sono state condotte in presenza di concentrazioni limitanti di pasta cellulare per 20 ore a 60°C.

Preparazione di ribavirina			Preparazione di Ara-A		
UdP	PNP	Resa di bioconversione	UdP	PNP	Resa di bioconversione
unità/ml		%	unità/ml		%
1	0,2	60,7	1	0,2	54,0
1	0,5	77,3	1	0,5	65,2
1	1	81,6	1	1	63,8
0,5	1	80,0	0,5	1	26,4
0,2	1	78,1	0,2	1	9,2



- 10 I risultati riportati nella tabella dimostrano che i rapporti ottimali di attività UdP e PNP sono di 1 : 1 e di 1 : 0,5 rispettivamente per la reazione di formazione di ribavirina e di Ara-A.

Questi dati sono stati confermati nello studio successivo in cui sono state utilizzate concentrazioni di enzima 10 volte superiori mantenendo le stesse proporzioni tra unità di UdP ed unità di PNP; in questo studio inoltre è stata determinata la cinetica di reazione prelevando campioni di miscela di reazione ad intervalli di 1 ora per l'analisi RP-HPLC e ed il calcolo della percentuale di bioconversione.

Nelle tabelle 9 e 10 sono riportati, rispettivamente per la reazione di preparazione di ribavirina e di Ara-A, i parametri ottimali in termini di percentuale di bioconversione e di tempo di reazione per le diverse proporzioni di UdP e PNP studiate.

**Tabella 9. Ottimizzazione delle condizioni di reazione per la preparazione di ribavirina.**

UdP unità/ml	PNP unità/ml	Tempo di reazione ore	Bioconversione %
10	2	20	89,4
10	5	4	89,5
10	10	2	91,2
5	10	2	91,2
2	10	2	91,1

**Tabella 10. Ottimizzazione delle condizioni di reazione per la preparazione di Ara-A.**

UdP unità/ml	PNP unità/ml	Tempo di reazione ore	Bioconversione %
-----------------	-----------------	--------------------------	---------------------



Ch

10	2	3	70,5
10	5	2	70,8
10	10	2	70,6
5	10	6	70,1
2	10	6	70,0

I risultati dello studio di ottimizzazione indicano che ribavirina può essere ottenuta in 2 ore con una resa di bioconversione del 91 % utilizzando 10 unità/ml sia di UdP che di PNP mentre Ara-A può essere ottenuta in 2 ore con una resa di bioconversione di circa il 71% utilizzando 10 unità/ml di UdP e 5 unità/ml di PNP.

A partire dal titolo in attività enzimatica dei ceppi di *E.coli* ricombinanti descritti nella presente invenzione è quindi possibile calcolare la quantità di pasta cellulare necessaria per preparare ribavirina ed Ara A in condizioni ottimali. Nel caso, per esempio, dei ceppi MG1655/pGM707 e MG1655/pGM716 aventi le attività specifiche riportate nella tabella 1, verranno utilizzati 0,4 e 0,2 grammi di pasta cellulare umida/100 ml di reazione rispettivamente per la preparazione di ribavirina e di Ara-A.

#### **Esempio N° 10**

Preparazione su scala pilota di Ara-A per reazione di transglicosilazione condotta con il ceppo di confronto di *E.aerogenes* e con i ceppi ricombinanti di *E.coli*.

Il processo di preparazione di Ara-A per transglicosilazione catalizzata da cellule di *E.aerogenes* o da cellule ricombinanti di *E.coli* MG1655/pGM716 sovraesprimenti UdP e PNP è stato studiato su una scala di reazione di 1000 litri.

50 kg di pasta cellulare umida ottenute dalla fermentazione di *E.aerogenes* sono stati risospesi in circa 200 litri di tampone fosfato 30 mM a pH 7 e mescolati con 800 litri di tampone fosfato in cui erano stati disciolti a caldo 5,4 kg di adenina (concentrazione finale 40 mM) e 8,9 kg di Ara-U (concentrazione finale 40 mM). La miscela è stata mantenuta a 60°C sotto agitazione per 20 ore, diluita a circa 3000 litri con H<sub>2</sub>O calda e diafiltrata su una membrana con cut-off di 50 kDa raccogliendo circa 5000 litri di ultrafiltrato. La resa di bioconversione determinata per RP-HPLC era di circa il 55 %. Il retentato contenente la pasta cellulare viene utilizzato per una successiva reazione. L'ultrafiltrato è stato concentrato a circa 1000 litri e raffreddato per raccogliere il precipitato costituito da Ara-A contaminato dall' adenina non reagita (circa 30 gr di adenina per 100 gr di Ara-A). 5 kg di Ara-A (resa complessiva circa 46 %) con un grado di purezza superiore al 99,5 % erano infine ottenuti dopo due cristallizzazioni da H<sub>2</sub>O.

5 kg di pasta cellulare umida ottenuta dalla fermentazione del ceppo MG1655/pGM716 sono stati risospesi in circa 20 litri di tampone fosfato 30 mM a pH 7 e mescolati con 980 litri di tampone fosfato in cui erano stati disciolti a caldo 10,1 kg di adenina (concentrazione finale circa 74,6 mM) e 18,3 kg di Ara-U (concentrazione finale circa 74,6 mM). La miscela è stata mantenuta a 60°C sotto agitazione per 4 ore ottenendo una resa di bioconversione di circa il 70%. La soluzione è stata riscaldata a circa 90°C, filtrata a caldo per eliminare le cellule ed il filtrato è stato raffreddato per precipitare Ara-A contaminato da adenina non reagita (circa 20 gr di adenina per 100 gr di Ara-A). 13 kg di Ara-A (resa complessiva 65%) con

G1

un grado di purezza superiore al 99,5% erano infine ottenuti dopo due cristallizzazioni da H<sub>2</sub>O.



## RIVENDICAZIONI

1. Vettore plasmidico ricombinante comprendente:
  - a) almeno una sequenza genica codificante per un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP; e,
  - 5 b) almeno una sequenza genica codificante per la resistenza ad un antibiotico.
2. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta almeno una sequenza codificante per la resistenza ad un antibiotico è una sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina e/o  
10 per la resistenza all'ampicillina
3. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal comprendere sia la sequenza codificante per il polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP che quella codificante per il polipeptide avente l'attività dell'enzima PNP.
- 15 4. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta almeno una sequenza genica codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP e detta sequenza genica codificante per la resistenza alla tetraciclina, sono clonate sul plasmide pUC18.
- 20 5. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 4 caratterizzato dal fatto che detta almeno una sequenza genica codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP è clonata sul plasmide pUC18 in fase di lettura rispetto al promotore *lac*.

6. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta sequenza codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima Udp è la sequenza *udp* di *E.coli*.
7. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che detta sequenza è EMBL X15689.
8. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta sequenza codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima è la sequenza *deoD* di *E.coli*.
9. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto che detta sequenza è EMBL M60917.
10. Vettore plasmidico secondo le rivendicazioni 1 e 4 caratterizzato dal fatto che detta sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina è il gene Tc di pBR322.
11. Vettore plasmidico pGM679 (SEQ ID NO 1).
11. Vettore plasmidico pGM708 (SEQ ID NO 2).
12. Vettore plasmidico pGM678 (SEQ ID NO 3).
13. Vettore plasmidico pGM707 (SEQ ID NO 4).
14. Vettore plasmidico pGM712 (SEQ ID NO 5).
15. Vettore plasmidico pGM716 (SEQ ID NO 6).
16. Cellule ospiti procariotiche caratterizzate dal fatto di contenere almeno un vettore plasmidico secondo le rivendicazioni 1-15.
17. Cellule ospiti secondo la rivendicazione 16 caratterizzate dal fatto di essere cellule batteriche.
18. Cellule ospiti secondo la rivendicazione 17 caratterizzate dal fatto di essere cellule di *Escherichia coli*.

19. Cellule ospiti secondo la rivendicazione 18 caratterizzate dal fatto di essere cellule del ceppo K12, preferibilmente MG1655 o DH5 $\alpha$ , e/o del ceppo B.
20. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19, sia separatamente che in combinazione, nella produzione di polipeptidi aventi l'attività dell'enzima Udp e/o dell'enzima PNP.
21. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione quali catalizzatori di reazioni di transglicosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice.
22. Uso secondo la rivendicazione 21 caratterizzato dal fatto che detta base accettrice è una base purinica o pirimidinica.
23. Uso secondo la rivendicazione 22 caratterizzato dal fatto che dette basi puriniche o pirimidiniche sono selezionate tra basi pirimidiniche e puriniche naturali o sostituite; basi puriniche sostituite nelle posizioni 1, 2 e 6; basi pirimidiniche sostituite in posizione 3 e 5; purina, 2-azapurina, 8-azapurina ed analoghi sostituiti, 1-deazapurina (imidazopiridina), 3-deazapurina, 7-deazapurina ed analoghi sostituiti; triazolo ed analoghi sostituiti; pirazolo ed analoghi sostituiti; composti imidazolici ed analoghi sostituiti.
24. Uso secondo la rivendicazione 21 caratterizzato dal fatto che detto nucleoside donatore è selezionato tra i nucleosidi naturali o modificati contenenti D-ribosio e 2'-deossiribosio; nucleosidi contenenti il gruppo ribosilico modificato nelle posizioni 2', 3' e 5'; nucleosidi nei quali lo zucchero sia  $\beta$ -D-arabinosio,  $\alpha$ -L-xilosio, 3'-deossiribosio, 3'-5'-deossiribosio, 2'-3'-dideossiribosio, 5'-deossiribosio, 2'-5'-

dideossiribosio, 2'-ammino-2'-deossiribosio, 3'-ammino-3'-deossiribosio, 2'-fluoro-2'-deossiribosio.

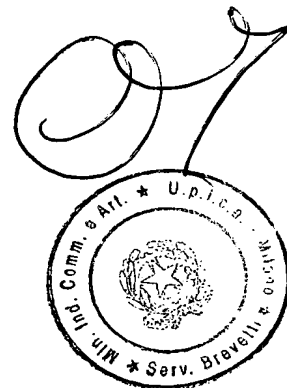
25. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione nella preparazione di analoghi di nucleosidi contenenti sistemi eterociclici con uno o più atomi di azoto in sostituzione di basi puriniche o pirimidiniche.

26. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione nella preparazione di zuccheri  $\alpha$ -pentosio-1-fosfati mediante reazioni di fosforolisi.

27. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione nella produzione di nucleosidi e di analoghi modificati.

p. Il Mandatario

Ing. Gianfranco Dragotti  
della SAIC BREVETTI SRL  
(Iscri. albo No. 300)



MI 9 8 A 002792

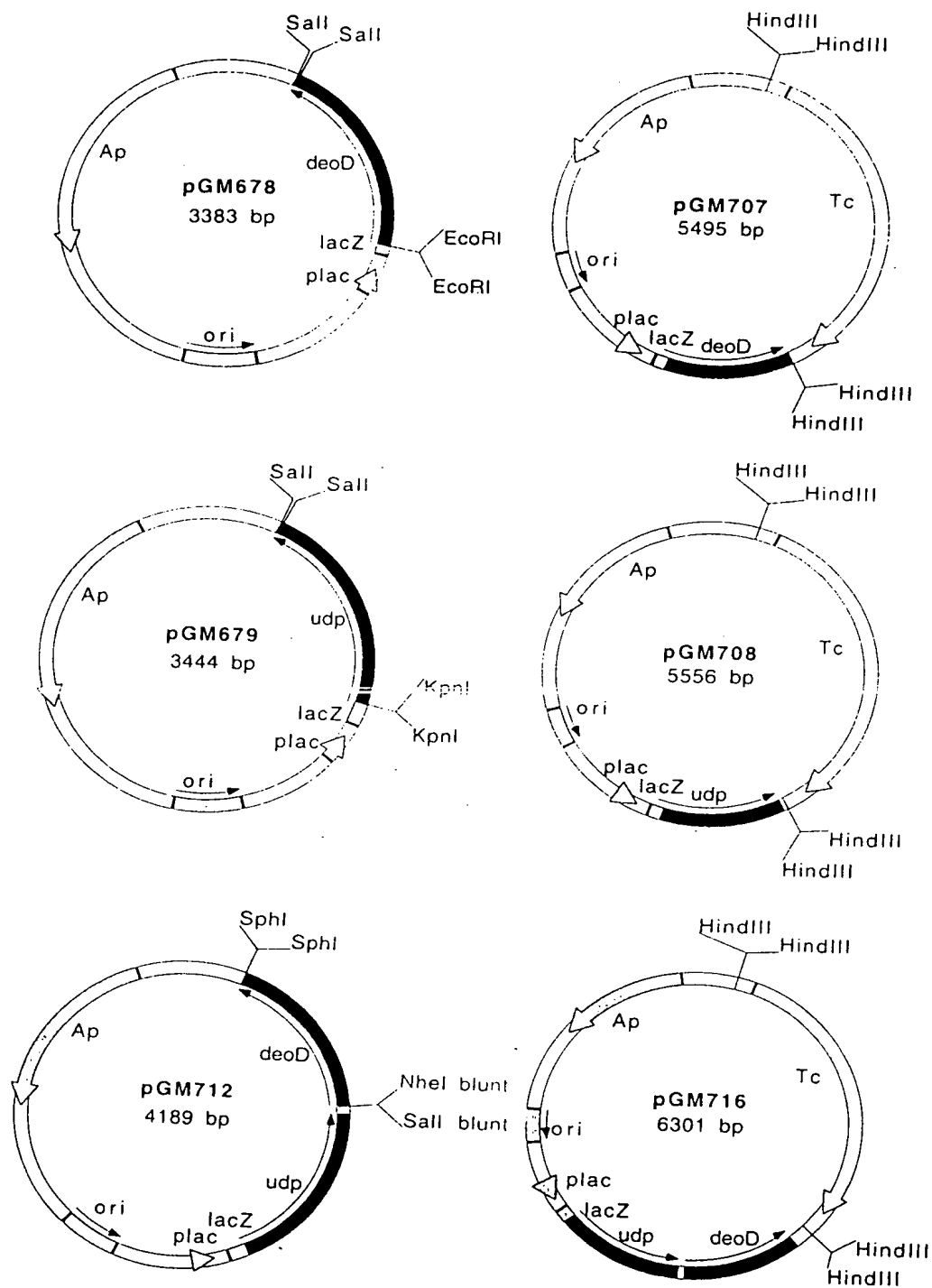
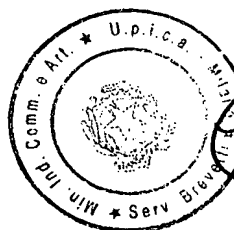


Figura 1. Mappa dei plasmidi in cui sono clonati i geni *deoD* e *udp* di *E. coli*.



*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*  
 Ing. Claudio D. Agosti





## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; NORPHARMA SPA

<120> Ceppi batterici ricombinanti per la produzione di  
nucleosidi naturali e di analoghi modificati

&lt;130&gt; 98DC

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3444

&lt;212&gt; DNA

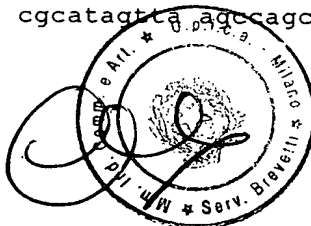
&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM679:  
gene udp clonato sul plasmide pUC18

&lt;400&gt; 1

gcgccccata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccgc attcattaat gcagctggca 60  
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120  
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttcgc gctcgtagt tgtgtggaat 180  
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240  
 cgggtaccatc catgtccaag tctgatgttt ttcattctcg cctcactaaa aacgatttac 300  
 aaggggctac gcttgccatc gtccctggcg acccggatcg tgtggaaaag atcgccgcgc 360  
 tgatggataa gccggttaag ctggcatctc accgcgaatt cactacctgg cgtgcagagc 420  
 tggatggtaa acctgttatc gtctgctcta ccggtatcgc cggcccgctt acctctattg 480  
 ctgttgaaga gctggcacag ctgggcattc gcaccttcct gcgtatcggg acaacgggcg 540  
 ctattcagcc gcatattaat gtgggtgatg tctgtgttac caccggctct gtccgtctgg 600  
 atggcgcgag cctgcacttc gcaccgctgg aattcccggc tgctcgctgat ttcgaatgta 660  
 cgactgcgct gggtgaagct gcgaaatcca ttggcgcgac aactcacgtt ggctgacag 720  
 cttcttctga taccttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggtcgcgtag 780  
 ttcgtcactt taaaggttct atggaagagt ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840  
 tggaatctgc aaccctgctg accatgtgtg caagtcaggg cctgcgtgcc ggtatggtag 900  
 cgggtgttat cgttaaccgc acccagcaag agatcccgaa tgctgagacg atgaaacaaa 960  
 ccgaaagcca tgcggtgaaa atcgtggtgg aagcggcgcg tcgtctgctg taattctctt 1020  
 gtcgacctgc aggcattgca gcttggaact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga 1080  
 aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagacat ccccttttcg ccagctggcg 1140  
 taatagcgaa gagggccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga 1200  
 atggcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcattctgtc ggtatttcac accgcatatg 1260  
 gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagttg agccagcccc gacaccgcgc 1320



aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc 1380  
 tgtgaccgct tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgatcatcac cgaaacgcgc 1440  
 gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt 1500  
 ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta tttgtttatt 1560  
 tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 1620  
 ataattattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt 1680  
 ttttgcgga ttttgccctt ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga 1740  
 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 1800  
 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt 1860  
 gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat 1920  
 acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 1980  
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata acactgcggc 2040  
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat 2100  
 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 2160  
 cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 2220  
 tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg aggcgataa 2280  
 agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc 2340  
 tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagc 2400  
 ctcccgatc gtatgtatct acacgacggg gactcaggca actatggatg aacgaaatag 2460  
 acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta 2520  
 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 2580  
 gatccttttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc 2640  
 gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc tgcgcgtaat 2700  
 ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga 2760  
 gctaccaact ctttttccga aggttaactg cttcagcaga gcgcagatac caaataactgt 2820  
 ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 2880  
 cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac 2940  
 cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg 3000  
 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 3060  
 tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag 3120  
 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct 3180  
 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 3240  
 agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tctggcctt 3300  
 ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 3360  
 tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgacgca 3420  
 gtcagtgagc gaggaagcgg aaga 3444



<210> 2

<211> 5556

<212> DNA

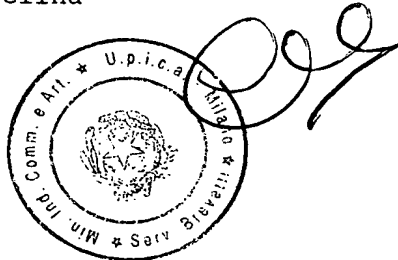
<213> Artificial Sequence

MI98A002792

<220>

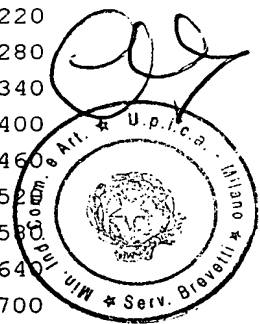
<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM708:  
 gene udp clonato sul plasmide pUC18 insieme al  
 gene per la resistenza alla tetraciclina

<400> 2



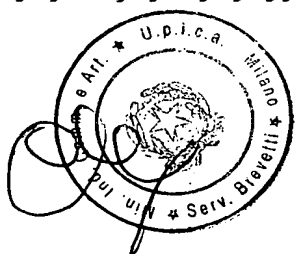
p. 1 Mod. datario  
 Ing. Giampaolo Dragotti

gcgcccataa cgcaaaccgc ctctccccgc gcggttgccg attcattaat gcagctggca 60  
 cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120  
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180  
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240  
 cggtagcatc catgtccaag tctgatgttt ttcactctcg cctcactaaa aacgatttac 300  
 aaggggctac gcttgccatc gtccttgccg acccggtatc tgtggaaaag atcgccgcgc 360  
 tgatggataa gccgggttaag ctggcatctc accgcgaatt cactacctgg cgtgcagagc 420  
 tggatggtaa acctgttatc gtctgtctta ccggtatcgg cggcccgctc acctctattg 480  
 ctgttggaaga gctggcacag ctgggcattc gcaccttcct gcgtatcggg acaacgggcg 540  
 ctattcagcc gcatattaat gtgggtgatg tcttggttac cacggcgtct gtcgctctgg 600  
 atggcgcgag cctgcacttc gcaccgctgg aattcccggc tgtcgtgat ttcgaatgta 660  
 cgactgcgct gggtgaagct gcgaaatcca ttggcgcgac aactcacgtt ggcgtgacag 720  
 cttcttctga taccttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggtcgcgtag 780  
 ttcgtcactt taaaggttct atggaagagt ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840  
 tggaatctgc aaccctgctg accatgtgtg caagtcaggg cctgcgtgcc ggtatggtag 900  
 cgggtgttat cgtaaacgc acccagcaag agatcccga tgctgagacg atgaaacaaa 960  
 ccgaaagcca tgcggtgaaa atcgtggtgg aagcggcgcg tcgtctgctg taattctctt 1020  
 gtcgacctgc aggcattgaa gctttatgct tgtaaacctg tttgtgaaaa aatttttaaa 1080  
 ataaaaaagg ggacctctag ggtccccaat taattagtaa tataatctat taaaggtcat 1140  
 tcaaaaggct atccaccgga tcagcttagt aaagccctcg ctgattttta atgcggatgt 1200  
 tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaagc cagcctttca tgatatactt 1260  
 cccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc ttaaaaaata taaaagcaga cttgacctga 1320  
 tagtttggt gtgagcaatt atgtgcttag tgcactaac gcttgagtta agccgcgcgc 1380  
 cgaagcggcg tcggcttgaa cgaattgtta gacattattt gccgactacc ttggtgatct 1440  
 cgcctttcac gtagtggaac aattcttcca actgatctgc gcgcgagat gcgcgcgtg 1500  
 cggctgctgg agatggcgga cgcgatggat atgttctgcc aaggggttgg ttgcgcattc 1560  
 acagttctcc gcaagaattg attggctcca attcttgag tggatgaatc gttagcgagg 1620  
 tgccgcgcgc ttcattcag gtgcaggtgg cccggtcca tgcaccgca cgcaacgcgc 1680  
 ggaggcagac aaggtatagg gcggcgccca caatccatgc caaccggtc catgtgctcg 1740  
 ccgaggcggc ataaatcgcc gtgacgatca gcggtccagt gatcgaagtt aggctggtaa 1800  
 gagccgcgag cgatecttga agctgtccct gatggtcgtc atctacctgc ctggacagca 1860  
 tggcctgcaa cgcgggcac cccgatgccgc cggaagcgag aagaatcata atggggaagg 1920  
 ccatccagcc tcgcgtcgcg aacgccagca agacgtagcc cagcgcgtcg gccgccatgc 1980  
 cggcgataat ggctgtcttc tcgccgaaac gtttggtggc gggaccagtg acgaaggctt 2040  
 gagcgagggc gtgcaagatt ccgaataacc caagcgacag gccgatcac gtcgcgtctc 2100  
 agcgaaagcg gtcctcgccg aaaatgacct agagcgtgc cggcacctgt cctacgagtt 2160  
 gcatgataaa gaagacagtc ataagtgcgg cgacgatagt catgccccgc gccaccgga 2220  
 aggagctgac tgggttgaa gctctcaagg gcatcggtcg acgctctccc ttatgcgact 2280  
 cctgcattag gaagcagccc agtagtaggt tgaggccgtt gagcaccgcc gccgcaagga 2340  
 atggtgcatg caaggagatg gcgcccacaa gtcccccgcc cacggggcct gccaccatac 2400  
 ccacgccgaa acaagcgctc atgagccgga agtggcgagc ccgatcttcc ccatcggtga 2460  
 tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc ggtgatgccg gccacgatgc 2520  
 gtccggcgta gaggatccac aggacgggtg tggtcgcat gatcgcgtag tcgatagtgg 2580  
 ctccaagtag cgaagcgagc aggactgggc ggcgccaaa cgggtcggac agtgctccga 2640  
 gaacgggtgc gcatagaaat tgcataacg catatagcgc tagcagcacg ccatagtgc 2700  
 tggcgatgct gtcggaatg acgatatccc gcaagaggcc cggcagtacc ggcataacca 2760  
 agcctatgcc tacagcatcc aggggtgacg tgccgaggat gacgatgagc gcattgttag 2820  
 atttcataca cgggtgcctga ctgcgttagc aatttaactg tgataaacta ccgcattaaa 2880



gctcatgcg atcagtgagg gtttgcaact gcgggtcaag gatctggatt tcgatcacgg 2940  
cacgatcatc gtgcgggagg gcaagggctc caaggatcgg gccttgatgt tacccgagag 3000  
cttggcacc agcctgcgcg agcaggggaa ttgatccggt ggatgacctt ttgaatgacc 3060  
tttaatagat tataattacta attaattggg gaccctagag gtccccctttt ttattttaaa 3120  
aattttttca caaaacggtt tacaagcata aagcttggca ctggccgctc ttttacaacg 3180  
tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt 3240  
cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 3300  
cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc 3360  
acaccgcata tgggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc 3420  
ccgacaccgg ccaacaccgg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc 3480  
ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc 3540  
accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat 3600  
gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc 3660  
tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 3720  
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 3780  
ccttattccc ttttttgcg cattttgcct tccgtttttt gctcaccag aaacgctggg 3840  
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg gggtacatcg aactggatct 3900  
caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac 3960  
ttttaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact 4020  
cggtcgccgc atacactatt ctgagaatga cttgggtgag tactcaccag tcacagaaaa 4080  
gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 4140  
taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 4200  
tttgcacaa atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 4260  
agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 4320  
caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat 4380  
ggaggcggat aaagttgcg gaccacttct gcgctcgcc cttccggctg gctggtttat 4440  
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc 4500  
agatggtaag cctcccgta tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 4560  
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc 4620  
agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaaag 4680  
gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc 4740  
gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 4800  
tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 4860  
gccggatcaa gagctacca ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 4920  
accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 4980  
accgcctaca tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 5040  
gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 5100  
ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 5160  
atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcgagacg 5220  
gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 5280  
cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 5340  
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg 5400  
gttccctggc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 5460  
tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 5520  
cgagcgcagc gagtcaatga gcgaggaagc ggaaga 5556

<210> 3  
<211> 3383



4

MI 9 8 A 002 7 9 2

P. L. Vardoulakis  
Ing. Gioiello

<212> DNA

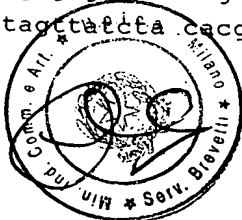
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM678:  
gene deoD clonato sul plasmide pUC18

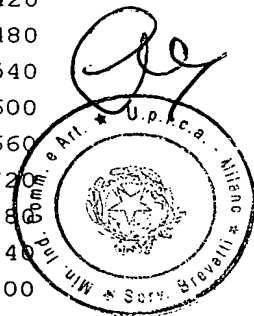
<400> 3

```
gcgccccata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgcccg attcattaat gcagctggca 60
cgacagggtt cccgactgga aagcggggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagtttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcttcca 240
tggctacccc acacattaat gcagaaatgg gcgatttcgc tgacgtagtt ttgatgccag 300
gcgaccgcgt gcgtgcgaag tatattgctg aaactttcct tgaagatgcc cgtgaagtga 360
acaacgttcg cggtagtctg ggcttcaccg gtacttacia aggccgcaaa atttccgtaa 420
tgggtcacgg tatgggtatc ccgtcctgct ccatctacac caaagaactg atcaccgatt 480
tcggcgtgaa gaaaattatc cgcgtgggtt cctgtggcgc agttctgccg cacgtaaaac 540
tgcgcgacgt cgttatcggt atgggtgcct gcaccgatcc caaagttaac cgcacccgtt 600
ttaaagacca tgactttgcc gctatcgctg acttcgacat ggtgcgtaac gcagtagatg 660
cagctaaagc actgggtatt gatgctcgcg tgggtaacct gttctccgct gacctgttct 720
actctccgga cggcgaaatg ttcgacgtga tggaaaaata cggcattctc ggctgggaaa 780
tggaagcggc tggtagctac ggcgtcgctg cagaatttgg cgcgaaagcc ctgaccatct 840
gcaccgtatc tgaccacatc cgcactcacg agcagaccac tgccgctgag cgtcagacta 900
ccttcaacga catgatcaaa atcgcaactg aatccgttct gctgggcgat aaagagtaag 960
tcgacctgca ggcatgcaag cttggcactg gccgtcggtt tacaacgtcg tgactgggaa 1020
aaccctggcg ttacccaact taatcgccct gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt 1080
aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgccgcagct gaatggcgaa 1140
tggcgccctg tgccgtatct tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg 1200
tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca 1260
acaccgcgtg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta cagacaagct 1320
gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 1380
agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct ttataggtta atgtcatgat aataatggtt 1440
tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatct 1500
ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa 1560
taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt 1620
tttgcgccat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctgggtgaa agtaaaagat 1680
gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag 1740
atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg 1800
ctatgtggcg cggattatct ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata 1860
cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 1920
ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataaa cactgcggcc 1980
aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg 2040
gggatcatg taactcgccct tgatcggttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 2100
gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact 2160
ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcgataaaa 2220
gttgacggac cactctctgc ctccggccct ccggctggct ggtttattgc tgataaatct 2280
ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc 2340
tcccgtatcg tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 2400
```





gcgattactt cgccaactat tgcgataaca agaaaaagcc agcctttcat gatatacttc 1200  
 ccaatttgtg tagggcttat tatgcacgct taaaaataat aaaagcagac ttgacctgat 1260  
 agtttggctg tgagcaatta tgtgcttagt gcatctaacg cttgagttaa gccgcgccgc 1320  
 gaagcggcgt cggcttgaac gaattgttag acattatttg ccgactacct tggatgatctc 1380  
 gcctttcacg tagtggacaa attcttccaa ctgatctgcg cgccgagatg cgccgcgtgc 1440  
 ggctgctgga gatggcggac gcgatggata tgttctgcca agggttgggt tgcgcattca 1500  
 cagttctccg caagaattga ttggctccaa ttcttggagt ggtgaatccg ttagcgaggt 1560  
 gccgccggct tccattcagg tcgaggtggc ccggctccat gcaccgcgac gcaacgcggg 1620  
 gaggcagaca aggtataggc cggcgctac aatccatgcc aaccggtcc atgtgctcgc 1680  
 cgaggcggca taaatcgccg tgacgatcag cgggtccagt atcgaagtta ggctggtaag 1740  
 agccgcgagc gatccttga gctgtccctg atggtcgtca tctacctgcc tggacagcat 1800  
 ggctgcaac gcgggcatcc cgatgccgc ggaagcgaga agaatacataa tggggaaggc 1860  
 catccagcct cgcgtcgca acgccagcaa gacgtagccc agcgcgtcgg ccgccatgcc 1920  
 ggcgataatg gcctgcttct cgccgaaacg tttgggtggc ggaccagtga cgaaggcttg 1980  
 agcgagggcg tgcaagattc cgaataccgc aagcgacagg ccgatcatcg tcgcgtcca 2040  
 gcgaaagcgg tctcgcgca aaatgaccca gagcgtgcc ggcacctgtc ctacgagttg 2100  
 catgataaag aagacagtca taagtgcggc gacgatagtc atgccccgcg cccaccggaa 2160  
 ggagctgact gggttgaagg ctctcaaggc catcggtcga cgctctccct tatgcgactc 2220  
 ctgcattagg aagcagccca gtagtaggtt gaggcggtt agcaccgccg ccgcaaggaa 2280  
 tggatcatgc aaggagatgg cgccaacag tccccggcc acggggcctg ccaccatacc 2340  
 cagccgaaa caagcgtca tgagccgaa gtggcgagcc cgatcttccc catcggtgat 2400  
 gtcggcgata taggcgccag caaccgcacc tgtggcgccg gtgatgccg ccacgatgcg 2460  
 tccggcgtag aggatccaca ggacgggtgt ggtcgccatg atcgcgtagt cgatagtggc 2520  
 tccaagtagc gaagcgagca ggactgggcg cgggcaaaag cggtcggaca gtgctccgag 2580  
 aacgggtgcg catagaaatt gcatcaacgc atatagcgt agcagcacgc catagtact 2640  
 ggagatgctg tcggaatgga cgalatcccg caagaggccc ggcagtaccg gcataaccaa 2700  
 gcctatgcct acagcatcca gggtagcggc gccgaggatg acgatgagcg cattgttaga 2760  
 tttcatacac ggtgcctgac tgcgttagca atttaactgt gataaactac cgcattaaag 2820  
 ctcatgcgga tcagtgaggg tttgcaactg cgggtcaagg atctggattt cgatcacggc 2880  
 acgatcatcg tgcgggagg caagggctcc aaggatcggg ccttgatgtt acccgagagc 2940  
 ttggcaccca gcctgcgca gcaggggaat tgatccggtg gatgacctt tgaatgacct 3000  
 ttaatagatt atattactaa ttaattgggg accctagagg tccccctttt tattttaaaa 3060  
 attttttcac aaaacggttt acaagcataa agcttggcac tggcgtcgt tttacaacgt 3120  
 cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagaca tccccctttc 3180  
 gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc ctcccaaca gttgcgcagc 3240  
 ctgaatggcg aatggcgct gatgcggtat tttctcctta cgatctgtg cggatatttca 3300  
 caccgcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgatagtt aagccagccc 3360  
 cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgtccc ggcatecgt 3420  
 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc accgtcatca 3480  
 ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg atacgctat ttttataggt taatgtcatg 3540  
 ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgc cggaacct 3600  
 atttgtttat ttttctaaat acattcaa atgtatccgc tcatgagaca ataacctga 3660  
 taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc 3720  
 cttattccct ttttgcggc atttgcctt cctgtttttg ctcaccaga aacgtggtg 3780  
 aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc 3840  
 aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact 3900  
 tttaaagtcc tgctatgtgg cgcggtatta tccgtattg acgccgggca agagcaactc 3960  
 ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag 4020



P. J. [Signature]  
 Reg. Clerk [Signature]



catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat 4080  
 aacactgceg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt 4140  
 ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcggt gggaaccgga gctgaatgaa 4200  
 gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcg 4260  
 aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccgcc aacaattaat agactggatg 4320  
 gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcgccc ttccggctgg ctggtttatt 4380  
 gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca 4440  
 gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat 4500  
 gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca 4560  
 gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg 4620  
 atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg 4680  
 ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat ctctcttgaga tccctttttt 4740  
 ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg gggttggttg 4800  
 ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata 4860  
 ccaaatactg tcccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 4920  
 ccgcctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 4980  
 tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 5040  
 tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 5100  
 tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa ggcgacagc 5160  
 tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgacga gggagcttc agggggaaac 5220  
 gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 5280  
 tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 5340  
 ttccctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcttctc cctgattct 5400  
 gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcccgcag ccgaacgacc 5460  
 gagcgcagcg agtcagtga cgaggaagcg gaaga 5495

<210> 5

<211> 4189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

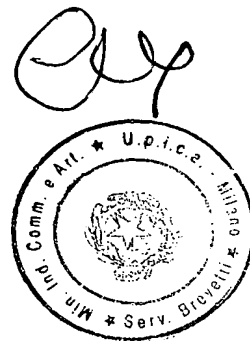
MI 98 A 002792

<220>

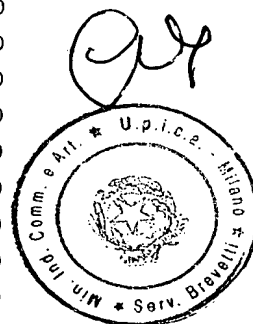
<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM712:  
 geni udp e deoD clonati sul plasmide pUC18

<400> 5

gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 60  
 cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120  
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180  
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240  
 cggtaccatc catgtccaag tctgatgttt tcatctcgg cctcactaaa aacgatttac 300  
 aaggggctac gcttgccatc gtccctggcg acccggatcg tgtggaaaag atcgccgcgc 360  
 tgatggataa gccgggttaag ctggcatctc accgcgaatt cactacctgg cgtgcagagc 420  
 tggatggtaa acctgttatc gtctgtctta ccggtatcgg cggcccgtct acctctattg 480  
 ctgttgaaaga gctggcacag ctgggcattc gcaccttctt gcgtatcggg acaacgggcg 540  
 ctattcagcc gcatattaat gtgggtgatg tccctgggttac cacggcgtct gtccgtctgg 600  
 atggcgcgag cctgcacttc gcaccgctgg aattcccgcc tgtcgtgatg ttcgaatgta 660  
 cgactgcgct gggtgaagct gcgaaatcca ttggcgcgac aactcacgtt ggcgtgacag 720



cttcttctga taccttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggtcgcgtag 780  
 ttgcgtcactt taaaggttct atggaagagt ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840  
 tggaatctgc aaccctgctg accatgtgtg caagtcaggg cctgcgtgcc ggtatggtag 900  
 cgggtgttat cgttaaccgc acccagcaag agatcccgaa tgctgagacg atgaaacaaa 960  
 ccgaaagcca tgcggtgaaa atcgtggtgg aagcggcgcg tcgtctgctg taattctctt 1020  
 gtcgactagc aggaggaatt cttccatggc taccacacac attaatgcag aaatgggcca 1080  
 tttcgtgac gtagttttga tgccaggcga cccgctgcgt gcgaagtata ttgctgaaac 1140  
 tttccttgaa gatgcccggtg aagtgaacaa cgttcgcggt atgctgggct tcaccggtac 1200  
 ttacaaaggc cgcaaaattt ccgtaatggg tcacgggtatg ggtatcccgct cctgctccat 1260  
 ctacacaaaa gaactgatca ccgatttcgg cgtgaagaaa attatccgct tgggttctctg 1320  
 tggcgagtt ctgcgcacg taaaactgcg cgacgtcgtt atcgggtatgg gtgctgcac 1380  
 cgattccaaa gttaaccgca tccgttttaa agaccatgac tttgccgcta tcgctgactt 1440  
 cgacatgggtg cgtaacgcag tagatgcagc taaagcactg ggtattgatg ctgcgctggg 1500  
 taacctgttc tccgctgacc tgttctactc tccggacggc gaaatgttcg acgtgatgga 1560  
 aaaatacggc attctcggcg tggaaatgga agcggctggt atctacggcg tcgctgcaga 1620  
 atttggcgcg aaagccctga ccactcgcac cgtatctgac cacatccgca ctcacgagca 1680  
 gaccactgcc gctgagcgtc agactacctt caacgacatg atcaaaatcg cactggaatc 1740  
 cgttctgctg ggcgataaag agtaagtcga cctgcaggca tgcaagcttg gcaactggcg 1800  
 tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgcttac ccaacttaac cgccttgca 1860  
 cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc 1920  
 aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac 1980  
 tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat 2040  
 agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 2100  
 tccccgcac cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgcagaggt 2160  
 tttcacgcgc atcacgaaa cgcgcgagac gaaaggccct cgtgatacgc ctatttttat 2220  
 aggttaatgt catgataata atggtttctt ayacgtcagg tggcactttt cggggaaatg 2280  
 tgcgcggaac cctattttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 2340  
 gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 2400  
 atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc 2460  
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 2520  
 tcgaactgga totcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 2580  
 caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgct attgacgccg 2640  
 ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 2700  
 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 2760  
 taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 2820  
 agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaaac 2880  
 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgac agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 2940  
 caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 3000  
 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 3060  
 ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 3120  
 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 3180  
 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 3240  
 attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 3300  
 ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 3360  
 aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 3420  
 gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 3480  
 cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 3540  
 gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 3600



agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 3660  
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta cgggataagg 3720  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 3780  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga 3840  
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 3900  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtccgtgctg gtttcgccac ctctgacttg 3960  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaaac gccagcaacg 4020  
cggccttttt acggttcctg gccttttgcg ggcccttttg tcacatgttc tttcctgcgt 4080  
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 4140  
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaaga 4189

<210> 6

<211> 6301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

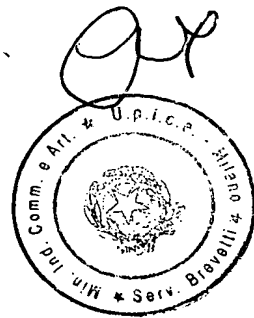
<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM716:  
geni deoD e udp clonati sul plasmide pUC18  
insieme al gene per la resistenza alla  
tetraciclina

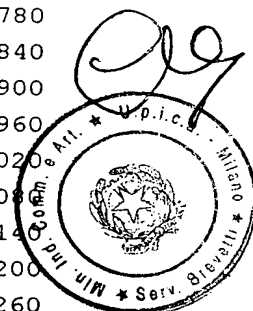


<400> 6

gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggcgc attcattaat gcagctggca 60  
cgacaggttt ccogactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120  
cactnattag gcacccccagg ctttacaccl tatgcttccg gctcgatatg tgtgtggaat 180  
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240  
cggtaccatc catgtccaag tctgatgttt ttcactctcg cctcactaaa aacgatttac 300  
aaggggctac gcttgccatc gtccctggcg acccggatcg tgtggaaaag atcgccgcgc 360  
tgatggataa gccggttaag ctggcatctc acccggaatt cactacctgg cgtgcagagc 420  
tggatggtaa acctgttatc gtctgctcta ccggtatcgg cgcccgctct acctctattg 480  
ctgttgaaga gctggcacag ctgggcattc gcaccttctt gcgtatcggt acaacgggcg 540  
ctattcagcc gcatattaat gtgggtgatg tcctggttac cacggcgtct gtccgtctgg 600  
atggcgcgag cctgcacttc gcaccgctgg aattcccggc tgctcgatg ttcgaatgta 660  
cgactgcgct ggttgaagct gcgaaatcca ttggcgcgac aactcacgtt ggctgacag 720  
cttctttctga taccttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggctcgctag 780  
ttcgtcactt taaaggttct atggaagagt ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840  
tggaatctgc aaccctgctg accatgtgtg caagtcaggg cctgcgtgcc ggtatggtag 900  
cgggtgttat cgtaaacgc acccagcaag agatcccgaa tgctgagacg atgaaacaaa 960  
ccgaaagcca tgcggtgaaa atcggtgtgg aagcggcgcg tcgtctgctg taattctctt 1020  
gtcgactagc aggaggaatt cttccatggc taccacacac attaatgcag aaatggcgga 1080  
tttcgctgac gtagttttga tgccaggcga cccgctgcgt gcgaagtata ttgctgaaac 1140  
tttccttgaa gatgcccggt aagtgaacaa cgttcgcggt atgctgggct tcaccggtag 1200  
ttacaaaggc cgcaaaattt ccgtaatggg tcacggtatg ggtatcccg cctgctccat 1260  
ctacacaaa gaactgatca ccgatttcgg cgtgaagaaa attatcccg tggttccctg 1320  
tggcgagtt ctgccgcacg taaaactgcg cgacgtcggt atcggtatgg gtgcctgcac 1380  
cgattccaaa gttaaccgca tccgttttaa agaccatgac tttgccgcta tcgctgactt 1440  
cgacatgggt cgtaacgcag tagatgcagc taaagcactg ggtattgatg ctccgctggg 1500



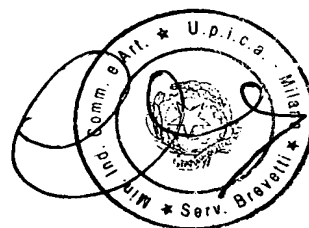
taacctgttc tccgctgacc tgtttctactc tccggacggc gaaatgttcg acgtgatgga 1560  
 aaaatacggc attctcggcg tggaaatgga agcggctggt atctacggcg tcgctgcaga 1620  
 atttggcgcg aaagccctga ccatctgcac cgtatctgac cacatccgca ctcacgagca 1680  
 gaccactgcc gctgagcgtc agactacctt caacgacatg atcaaaatcg cactggaatc 1740  
 cgttctgctg ggcgataaag agtaagtcga cctgcaggca tgcaagcttt atgcttgtaa 1800  
 accgttttgt gaaaaaattt ttaaaataaa aaaggggacc tctaggggtcc ccaattaatt 1860  
 agtaatataa tctattaaag gtcattcaaa aggtcatcca ccggatcagc ttagtaaagc 1920  
 cctcgctaga ttttaatgcg gatgttgcca ttacttcgcc aactattgcy ataacaagaa 1980  
 aaagccagcc tttcatgata tatctcccaa tttgtgtagg gcttattatg cacgcttaaa 2040  
 aataataaaa gcagacttga cctgatagtt tggctgtgag caattatgtg cttagtgcac 2100  
 ctaacgcttg agttaagccg cgcgcgaag cggcgtcggc ttgaacgaat tgtagacac 2160  
 tatttgccga ctaccttggc gatctcgctt ttcacgtagt ggacaaattc ttccaactga 2220  
 tctgcgcgcc gagatgcgcc gcgtgcggct gctggagatg gcggacgca tggatatgtt 2280  
 ctgccaaggg ttggtttgcy cattcacagt tctccgcaag aattgattgg ctccaattct 2340  
 tggagtggcg aatccgcttag cgaggtgccg ccggcttcca ttcaggtcga ggtggcccg 2400  
 ctccatgcac cgcgacgcaa cgcggggagg cagacaaggt atagggcggc gcctacaatc 2460  
 catgccaaac cgttccatgt gctcgcggag gcggcataaa tgcgccgtgac gatcagcgg 2520  
 ccagtgatcg aagttaggct ggtaagagcc gcgagcgatc cttgaagctg tccctgatgg 2580  
 tegtcatcta cctgcctgga cagcatggcc tgcaacgcgg gcatcccgat gccgccgaa 2640  
 gcgagaagaa tcataatggg gaaggccatc cagcctcgcy tcgcgaacgc cagcaagac 2700  
 tagccacgcg cgtcggccgc catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg 2760  
 gtggcgggac cagtgcgaa ggcttgagcy agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc 2820  
 gacaggccga tcatcgctgc gctccagcga aagcggctct cgcgaaaat gaccagagc 2880  
 gctgccggca cctgtcctac gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgac 2940  
 atagtcatgc cccgcgccc cccgaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcac 3000  
 ggtcgagct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 3060  
 ccgttgagca cgcgcgcgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 3120  
 ccggccacgg ggccctgccac cataccacg ccgaaacaag cgtcatgag cccgaagtgg 3180  
 cgagcccgat ctcccccac ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 3240  
 gcgcgggtga tgcggccac gatgcgtccg gcgtagagga tccacaggac ggggtgtggtc 3300  
 gccatgatcg cgtagtcgat agtggtcca agtagcgaag cgagcaggac tgggcggcg 3360  
 ccaaagcggc cggacagtgc tccgagaacg ggtgcgcata gaaattgcat caacgcata 3420  
 agcgtagca gcacgccata gtgactggcg atgctgtcgg aatggacgat atcccgcaag 3480  
 agggccggca gtaccggcat aaccaagcct atgcctacag catccagggt gacgggtgccg 3540  
 aggatgacga tgagcgcatt gttagatttc atacacggtg cctgactgcg ttagcaattt 3600  
 aactgtgata aactaccgca ttaaagctca tgcggatcag tgagggtttg caactgcggg 3660  
 tcaaggatct ggatttcgat cagggcacga tcatcgctgc ggagggcaag ggctccaagg 3720  
 atcgggcctt gatgttacc gagagcttgg caccagcct gcgcgagcag ggggaattgat 3780  
 ccggtggatg accttttgaa tgacctttaa tagattatat tactaattaa ttggggaccc 3840  
 tagaggctcc cttttttatt ttaaaaattt tttcacaaaa cggtttacaa gcataaagct 3900  
 tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggt acccaactta 3960  
 atcgcttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gccgcaccg 4020  
 atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgat cggattttt 4080  
 tcttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatggtg cactctcagt acaatctgct 4140  
 ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac 4200  
 gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca 4260  
 tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac 4320  
 gcctattttt ataggttaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt 4380



ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctatth gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt 4440  
 atccgctcat gagacaataa ccttgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta 4500  
 tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg 4560  
 tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac 4620  
 gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaaagt ccttgagagt tttcgccccg 4680  
 aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc 4740  
 gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg 4800  
 ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat 4860  
 gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg 4920  
 gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg 4980  
 atcgttgagg accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc 5040  
 ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt 5100  
 cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct 5160  
 cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccgggtgag cgtgggtctc 5220  
 gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca 5280  
 cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct 5340  
 cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt 5400  
 taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga 5460  
 ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca 5520  
 aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac 5580  
 caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 5640  
 taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag 5700  
 gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac 5760  
 cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt 5820  
 taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg 5880  
 agngaagac ctacaccgaa ctyagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc 5940  
 ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc 6000  
 gcacgagga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc 6060  
 acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcgagc ctatggaaaa 6120  
 acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 6180  
 tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg 6240  
 ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag 6300  
 a

6301

MI9 8 A 002792



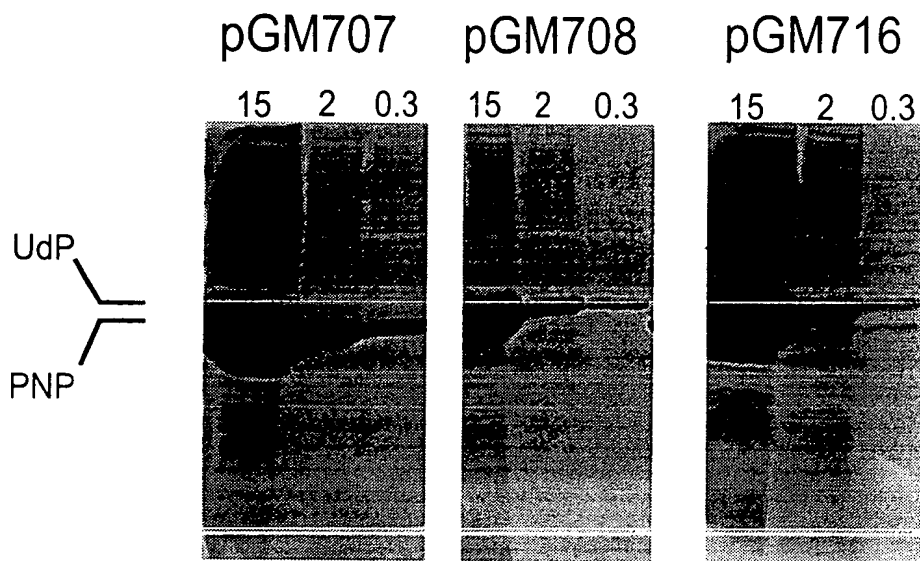
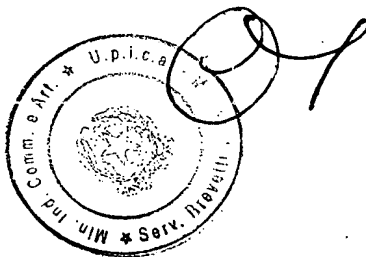


Figura 4. Espressione di PNP e UdP nei ceppi ricombinanti..

Le proteine sono state estratte dai ceppi MG1655/pGM707 , MG1655/pGM708 e MG1655/pGM716 cresciuti una notte in LD + tetraciclina (12.5 mg/ml) e separate per elettroforesi su gel di poliacrilamide 15%. Di ogni estratto sono stati caricati rispettivamente 15ml, 2ml e 0.3 m

MI 9 8 A 0 0 2 7 9 2



p. li Ministero  
Ing. Gianfranco Tognoli